

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-231873

(43) 公開日 平成4年(1992)8月20日

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/533		8310-2J		
C 0 7 D 405/04		8829-4C		
405/06		8829-4C		
405/08		8829-4C		
405/10		8829-4C		

審査請求 未請求 請求項の数12(全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-111774

(22) 出願日 平成3年(1991)5月18日

(31) 優先権主張番号 524, 195

(32) 優先日 1990年5月18日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391008788
アボット・ラボラトリーズ
ABBOTT LABORATORIES
アメリカ合衆国60084-3500イリノイ州ア
ボット・パーク、ワン・アボット・パー
ク・ロード (番地の表示なし)

(72) 発明者 マシー・アダムジツク
アメリカ合衆国60031イリノイ州ガーニー、
クワイル・ヘブン・コート174番

(72) 発明者 ルイス・エイ・カンタレロ
アメリカ合衆国60060イリノイ州マンデレ
イン、ダンレア・ドライブ1319番

(74) 代理人 弁理士 青山 薫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バルビツレート検定法、トレーサー、免疫抗原、抗体およびキット

(57) 【要約】

【目的】 本発明はバルビツレートの蛍光偏光免疫学的検定法、並びに該検定法に用いるトレーサー、免疫抗原および抗体、これらの成分を含有する試薬キットを提供する。

【構成】 本発明のトレーサーおよび免疫抗原は置換バルビツレート化合物から製造され、トレーサーの中にフルオレセイン成分が含まれ、一方、免疫抗原の一部としてポリ(アミノ酸)が存在する。本発明の検定法は、抗血清およびトレーサーを含有する試料を透過した平面偏光の偏光保留率を測定することによって行う。

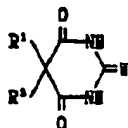
(2)

特開平4-231873

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式

【化1】

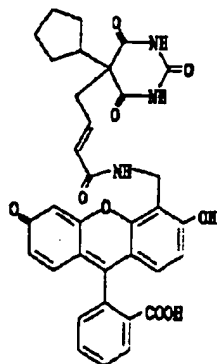


(式中、Wは酸素または硫黄；R¹は直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1～12個の炭素原子および0～1個のハロゲン原子を有する、アルキル、アルケニル、アリール、またはアルキニル基；R²はR¹-F；Fはフルオレseinまたはフルオレsein誘導体；およびR³は(a)直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル0～15個の炭素原子およびO、N、S、PまたはFのヘテロ原子を有する結合基、または(b)トータル0～5個のヘテロ原子を有する結合基である)で示されるトレーサー。

【請求項2】 R¹がトータル2～7個の炭素原子を有するアルキル基、およびR²がトータル0～10個の炭素原子およびヘテロ原子を有する結合基である請求項1に記載のトレーサー。

【請求項3】 式

【化2】

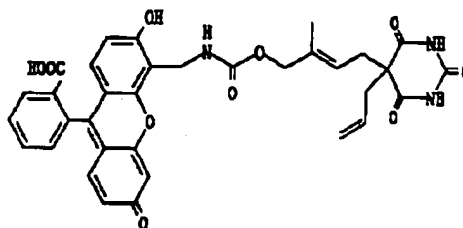


Rは(a)末端にQに結合する-CH₂-, -CH=, -C-または-NH-を有する結合基、(b)直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル0～20個の炭素原子およびO、N、S、PまたはFのヘテロ原子を有する結合基、または(c)トータル0～7個のヘテロ原子を有する結合基である)の免疫抗原に対して産生する単クローン性または多クローン性抗体を含むバルビツレート抗血清と、およびバルビツレート抗血清の存在に対して検知しうる蛍光偏光応答をもたすことができる、請求項1に記載のトレーサー化合物と接触せしめ、(B)工程(A)から得られる溶液に平面偏光

*で示される請求項1に記載のトレーサー。

【請求項4】 式

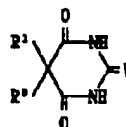
【化3】



で示される請求項1に記載のトレーサー。

【請求項5】 生物学的液体中のバルビツレートの存在もしくはその量を測定する方法であって、(A)試料を、式：

【化4】



(式中、Wは酸素または硫黄；R¹は1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1～12個の炭素原子および0～1個のハロゲン原子を有する、アルキル、アルケニル、アリール、またはアルキニル基；R²はR-Q；Qはポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸)誘導体、または他の免疫抗原的に活性な担体；および

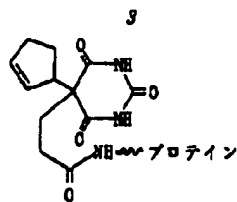
O
|
Rは(a)末端にQに結合する-CH₂-, -CH=, -C-または-NH-を有

を有して、蛍光偏光応答を得、次いで(C)工程(B)の溶液の蛍光偏光応答を、試料中のバルビツレートの存在もしくはその量の測定として検出することと特徴とするバルビツレートの測定法。

【請求項6】 抗体が式：

【化5】

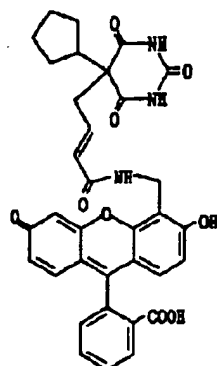
(3)



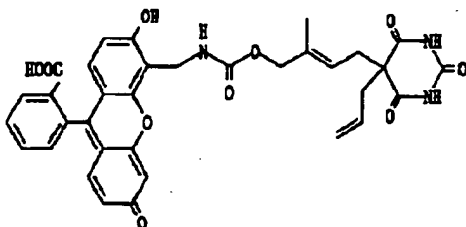
の免疫抗原に対して産生する請求項5に記載の測定法。

【請求項7】 トレーサー化合物が式：

【化6】



または

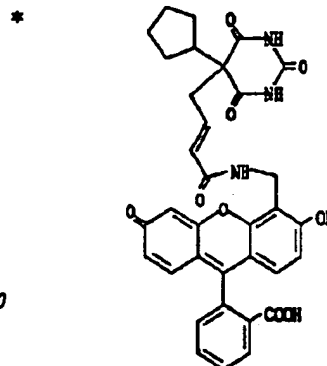


の化合物である請求項5に記載の測定法。

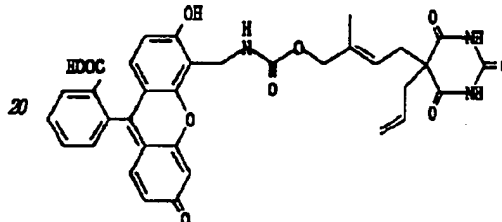
【請求項8】 トレーサー化合物が式：

【化7】

Rは(a)末端にQに結合する $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=-$ 、 $-\text{C}-$ または $-\text{NH}-$ を有する結合基、(b)直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル0~20個の炭素原子およびO、N、S、PまたはFのヘテロ原子を有する結合基、または(c)トータル0~7個のヘテロ原子を有する結合基である)の免疫抗原に対して産生する単クローン性または多クローン性抗体を包含することを特徴とする試薬キット。



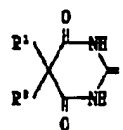
または



の化合物である請求項6に記載の測定法。

【請求項9】 生物学的流体中のバルビツレートが存在もしくはその量を測定する試薬キットであって、(A)請求項1に記載のトレーサー、および(B)式：

【化8】

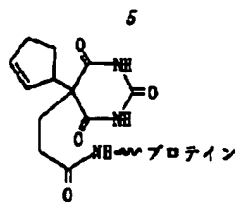


(式中、Wは酸素または硫黄；R¹は1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1~12個の炭素原子および0~1個のハロゲン原子を有する、アルキル、アルケニル、アリール、またはアルキニル基；R²はR-Q；Qはポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸)誘導体、または他の免疫抗原的に活性な担体；および

【請求項10】 リボフラビンによる蛍光干渉を減少させるのに有効量のリボフラビン結合タンパク質をさらに包含する請求項9に記載の試薬キット。

【請求項11】 抗体が式：

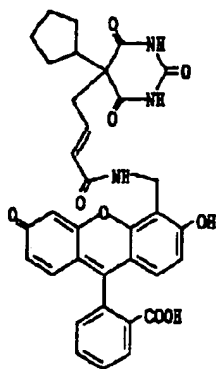
【化9】



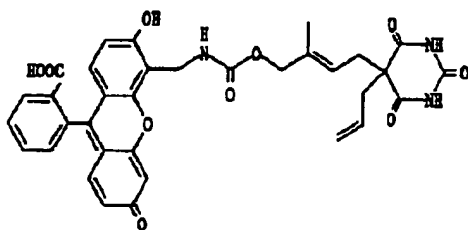
の免疫抗原に対して産生する請求項9または10に記載の試薬キット。

【請求項12】 トレーサーが式:

【化10】



または



のトレーサーである請求項9または10に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はバルビツレート検定法、トレーサー、免疫抗原、抗体およびキット、詳しくは、流体、特に血清、血漿または尿などの生物学的流体中のバルビツレートの量を測定する蛍光偏光免疫学的検定操作のための方法および試薬、並びに該試薬の製造法に関する。更に詳しくは、本発明は、(1)試料中のバルビツレートの量を測定する試薬(トレーサーおよび抗体、およびトレーサーと抗体を含有するキット)、(2)抗体を発生させるのに用いる免疫抗原化合物、(3)トレーサーおよび免疫抗原化合物を製造する合成法、および(4)当該検定を行う分析法に関する。

【0002】

6

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】バルビツレートは中枢神経系抑制薬である。治療上、バルビツレートは鎮静薬、催眠薬および抗けいれん薬として用いられている。バルビツレートの法的利用可能性は衰退しつつあるが、バルビツレートは頻りに乱用される鎮静薬あるいは催眠薬であって、一般に自殺のために用いられている。

【0003】バルビツレートの生理学的吸収、作用および毒性は、広範囲に変化し、かつ5-置換基およびイミノ水素の性質に左右される。血液中の約35%のバルビツレートは血漿プロテインと結合する。バルビツレートは各種の組織や器官に分布する。バルビツレートは主に肝臓で代謝し、そして数種のものを除き、一般に主に非活性代謝産物として尿の中に排泄される。

【0004】最も普遍に乱用されるバルビツレートは、短時間作用乃至中間時間作用型の、セコバルビタール、ペンバルビタール等である。これらのバルビツレートは、刺激薬の使用に基づく興奮状態を和らげるのに広く用いられている。これら薬物に対する耐性は、慢性使用によって進行し、そして該薬物の過剰投与量あるいは突然の過剰のいずれかによって死を招くことがある。

【0005】従来、尿中のバルビツレート量は一般的に、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、酵素免疫学的検定法(EIA)、基質-結合蛍光免疫学的検定法(SLFIA)および放射免疫学的検定法(RIA)によって測定されていた。これらの方法は、薬物量の検出に対してかなり特異的であるが、欠点を否定できない。すなわち、HPLCおよびGC法には試料の抽出操作が必要で、かつ検定時間が長い。EIAおよびSLFIAでは共に酵素反応が必然的に伴い、かつ以下の欠点を有する。

- 1) 試薬が比較的に不安定である。
- 2) EIAまたはSLFIAの酵素反応に影響を及ぼしうる、生物学的試料中のいずれかの成分(たとえば酵素インヒビターまたは阻害する反応を触媒促進する酵素)が検定結果に影響を及ぼす。
- 3) EIAおよびSLFIAは吸収度または蛍光のいずれかを測定し、そして吸収度または蛍光に影響を及ぼしうる、生物学的試料中のいずれかの成分(たとえば脂質、ヘモグロビン、ビリルビンまたは他の発色団もしくは発光団)が該検定から得られる結果の正確さに影響を及ぼす。

一方、RIAの試薬は以下の欠点を有する。

- 1) 半減期が短い。
- 11) 放射能が生命を危険にさらす。
- 111) 放射性物質の貯蔵および廃棄に問題が付随する。

【0006】一般に、試験試料中のリガンドを測定するのに、競合結合免疫学的検定法が使用されている。ここで、“リガンド”は、競合結合免疫学的検定法で定量的に測定される、生物学的に興味のある物質である。リガ

ンドは標識試薬、または“リガンド標識体”もしくは“トレーサー”と競合するが、これはリガンドおよびリガンド標識体に対し特有の抗体における限られた数の結合部位においてである。試料中のリガンド濃度は、抗体に結合するリガンド標識体の量を決定する。結合するリガンド標識体の量は、試料中のリガンド濃度に反比例するが、これはリガンドおよびリガンド標識体がそれぞれ、その濃度に比例して抗体に結合するからである。

【0007】蛍光偏光は、競合結合免疫学的検定法において生じるトレーサー-抗体接合の量を測定するのに定量手段を付与する。蛍光偏光法は、蛍光標識化合物が、平面偏光によって励起されるとき、分子回転の速度に対して逆比的に關係する偏光率を持つ蛍光を発するという原理に基づく。従って、トレーサー-抗体接合を有する蛍光標識が平面偏光と共に励起されると、発光団(fluorophore)は光が吸収されおよび発射される時間の間で回転するのを抗体によって抑制されるため、発射した光は高偏光の状態のままに残存する。これに対し、未結合トレーサーが平面偏光によって励起されると、その回転は対応するトレーサー-抗体接合の回転よりはるかに速くなる。その結果、未結合トレーサー分子から発した光は偏光しなくなる。

【0008】これまで、尿におけるバルビツレートや他の“乱用薬物”の蛍光偏光法による正確な測定が妨げられてきた問題は、リポフラビン干渉にある。リポフラビン、あるいはビタミンB₂は多くの食品や商業上入手しうるビタミン補給品の一般的成分である。リポフラビンは主に尿中に排泄され、かつフルオレセインに極めて類する蛍光スペクトルを有する。その結果、尿試料中にたとえ大したことのない量でもリポフラビンが存在すると、間違った結果をもたらしうる干渉が起る。リポフラビンの正常な消費では、痕跡量を越えるリポフラビンを尿中に生成させるとは思われないが、バルビツレート使用の発覚の阻止を望む人による過剰量のビタミン補給品の消費によって、試験結果が容易にゆがめられる。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の特徴は、一般に用いられるバルビツレートに対するより均一なクロス反応性(cross-reactivity)にある。さらに本発明は、特にリポフラビン干渉を伴わないバルビツレートの測定に

Rは(a)末端にQに結合する-CH₂-, -CH=, -C-または-NH-を有する結合基、(b)直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル0~20個の炭素原子およびO、N、S、PまたはFのヘテロ原子を有する結合基、または(c)トータル0~7個のヘテロ原子を有する結合基である。

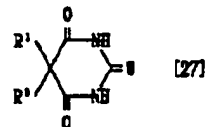
【0012】本発明の第2の観点、新規な免疫抗原

*レーザーを用いる検定法を提供することによって、当該技術の進歩を図るものである。

【0010】すなわち、本発明はバルビツレートの蛍光偏光検定法、該検定法に用いるトレーサー、免疫抗原および抗体、試薬キット、並びに上記トレーサー、免疫抗原および抗体の製造法に関連する。

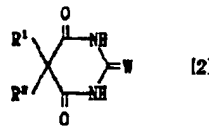
【0011】本発明の第1の観点は、新規構造を有するユニークなトレーサーおよび免疫抗原の発見に關係する。この第1観点によれば、当該トレーサーおよび免疫抗原はそれぞれ、式:

【化11】



および

【化12】



で示され、式中、トレーサー[27]の場合、Wは酸素または硫黄; R¹は直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1~12個の炭素原子および0~1個のハロゲン原子を有する、アルキル、アルケニル、アリール、またはアルキニル基; R²はR¹-F; Fはフルオレセインまたはフルオレセイン誘導体; およびR³は(a)直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル0~15個の炭素原子およびO、N、S、PまたはFのヘテロ原子を有する結合基、または(b)トータル0~5個のヘテロ原子を有する結合基である。また免疫抗原[2]の場合、Wは酸素または硫黄; R¹は1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1~12個の炭素原子および0~1個のハロゲン原子を有する、アルキル、アルケニル、アリール、またはアルキニル基; R²はR-Q; Qはポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸)誘導体、または他の免疫抗原的に活性な担体; および

O

↓

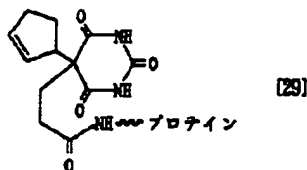
対して製造される単クローン性または多クローン性抗体に關係する。この第2観点によれば、該抗体は免疫抗原[2]に応じて製造される。本発明の最も好ましい抗体は、式:

【化13】

(6)

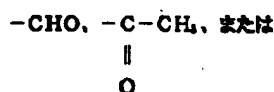
特開平4-231873

9

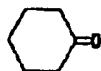


で示される新製免疫抗原[29]に応じて製造される。*

XがNH₂, Cl, Br, I, OH, CO₂H, O-C-Cl, -C-CH₂, I,



[化14]



；およびRが直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、7個以下のヘテロ原子またはトータル0~20個の炭素原子およびヘテロ原子を有する結合基である化合物[2]を、ポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸)誘導体または他の免疫抗原的に活性な担体とカップリング反応させる工程から成る方法によって合成することができる。

【0014】本発明の第4の観点によれば、式[27]において、Wが酸素または硫黄；R¹が直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1~12個の炭素原子を有するアルキル、アルケニルまたはアルキニル基；R²がCH₂-R-Y；YがNH₂, COOH, COCl, SO₂H, SO₂C I, SH, CHO, CN, OHまたはI；およびRが直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、10個以下のヘテロ原子またはトータル0~20個の炭素原子およびヘテロ原子を有する結合基である化合物[27]を、フルオレセインまたはフルオレセイン誘導体とカップリング反応させることによる、トレーサーの製造法が提供される。

【0015】好ましくは、トレーサーは、式[27]において、WおよびR¹が前記と同意義；R²が分枝鎖状に配列され、かつ環構造を持たない、4または5個の炭素原子を有するアルキル基；YがNH₂またはCOOH；およびRが直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ環構造を持たない、3個以下のヘテロ原子またはトータル3~5個の炭素原子およびヘテロ原子を有する結合基である前記化合物[27]をカップリング反応させることによって製造される。

【0016】好ましいフルオレセイン誘導体としては、アミノ、アミド、アミジノ、尿素、チオ尿素、カルバミド、チオカルバミドまたはトリアジニルアミノ誘導体が

10

*【0013】本発明の第3の観点によれば、免疫抗原は、式[2]において、Wが酸素または硫黄；R¹が直鎖または分枝鎖状に配列され、かつ1個以下の脂肪族または芳香族環構造を持ち、トータル1~12個の炭素原子を有する、アルキル、アルケニル、アリールまたはアルキニル基；R²がCH₂-R-X；



挙げられる。現時点で最も好ましい誘導体はアミノ誘導体、特にアミノメチルフルオレセインである。

【0017】本発明の第5の観点は、リボフラビンによる潜在的蛍光干渉の排除に関する。当該検定法で用いる各試料または1種以上の試薬のいずれかに、直接リボフラビン結合タンパク質(RBP)を加えると、RBPは存在する全リボフラビンと結合してRBP-リボフラビン錯体となり、このようにして蛍光干渉が排除される。この目的に、他の蛍光消光物質も利用することができる。

【0018】本発明の第6の観点によれば、バルビツレート濃度の検出または測定法が提供される。試料を、バルビツレート抗血清と、およびバルビツレート抗血清の存在に対して検知する蛍光偏光応答をもたらしことができるフルオレセイン含有バルビツレート誘導体と接触せしめる。得られる溶液中に平面偏光を通して、蛍光偏光応答を得、次いでこの蛍光偏光応答を、試料中のバルビツレートの量の濃度として検出する。

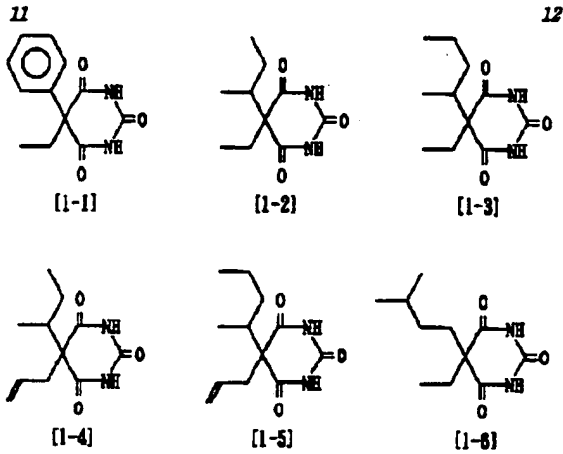
【0019】本発明の第7の観点は、単一検定法で一般使用のバルビツレートを検出するのに有用な安定化した試薬キットに関する。この試薬キットは、本発明の新規方法で試薬として用いる新規トレーサー、またはその塩を含有する。本発明に係る試薬キットの他の成分としては、リボフラビンによる蛍光干渉を減少させるのに有効量のリボフラビン結合タンパク質および一般使用のバルビツレートを明確に認識しかつ該バルビツレートに結合しうる免疫抗原に対して産生する抗体試薬および本発明の新規トレーサー試薬を含有する溶液が挙げられる。

【0020】本発明の他の目的および付随利点については、以下の詳細な説明および実施例の記載から容易に理解されるだろう。

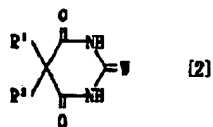
【0021】下記に示す式中、記号「F」はフルオレセイン成分を表わし、他の各種記号については後記で説明する。式：

[化15]

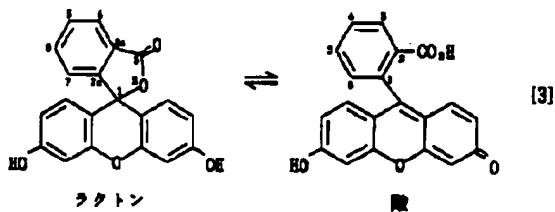
(7)



は、本発明に従って準定量的に測定される各種バルビツ
レート的一般構造式を示す。式：
【化16】



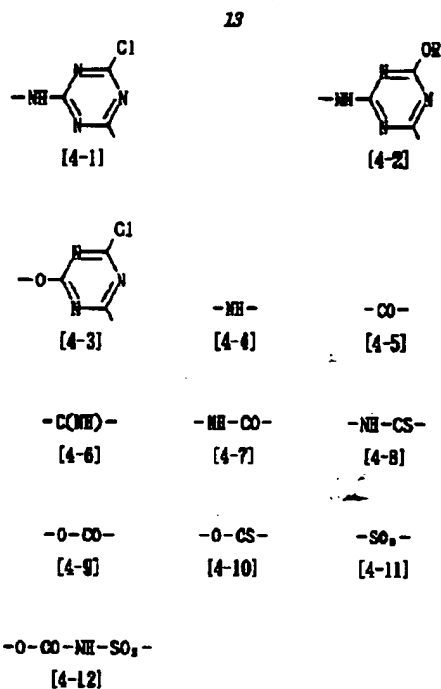
は、本発明の免疫抗原並びに該免疫抗原の製造に用いる
各種反応体的一般構造式を示す。式：
【化17】



は、本発明のトレーサーに含まれるフルオレセイン成分 30
の交互構造式を示す。式：
【化18】

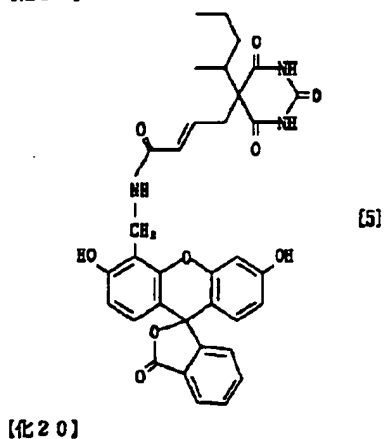
(8)

特開平4-231873



は、式〔2〕がトレーサーの前駆体を表わすとき、フル
オレセイン成分を式〔2〕の前駆体にカップリングさせる
各種結合基を示す。式：

〔化19〕



10

〔化21〕

20

〔化22〕

30

40

〔化23〕

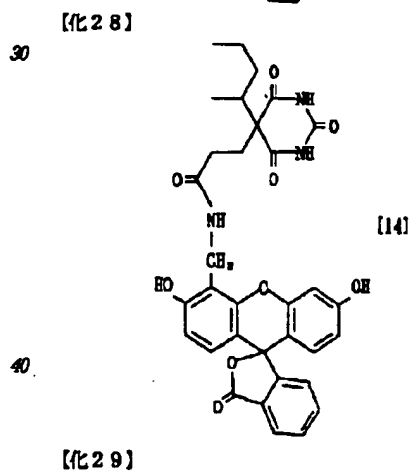
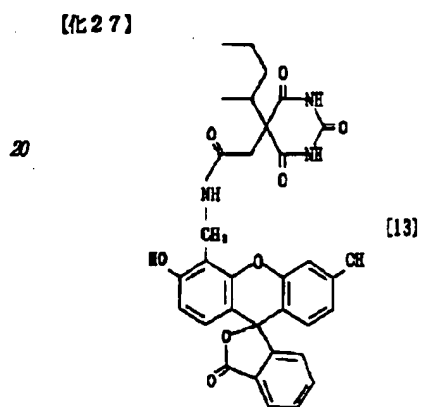
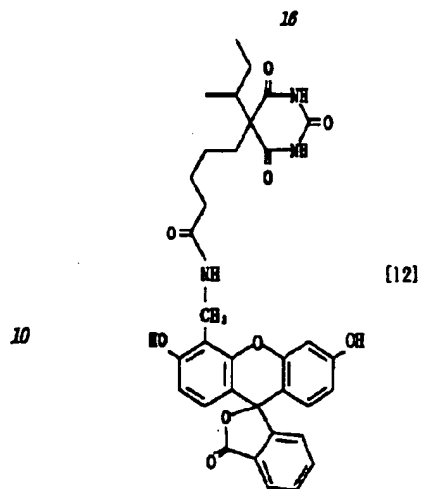
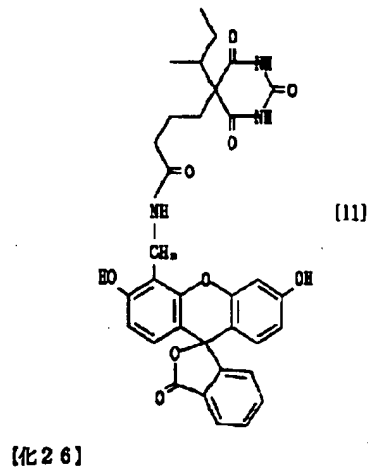
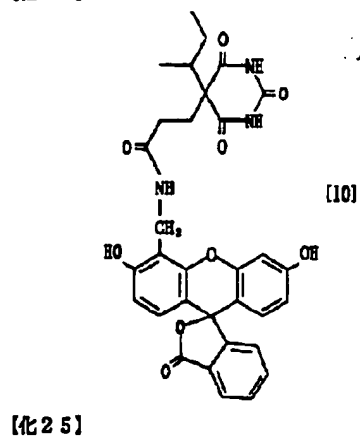
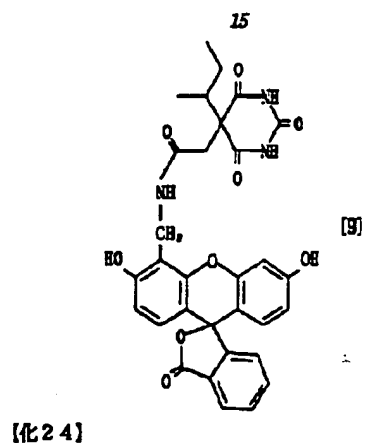
〔6〕

〔7〕

〔8〕

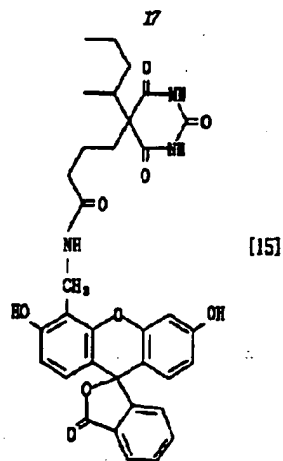
(9)

特開平4-231873

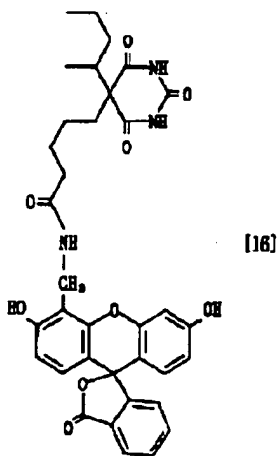


(10)

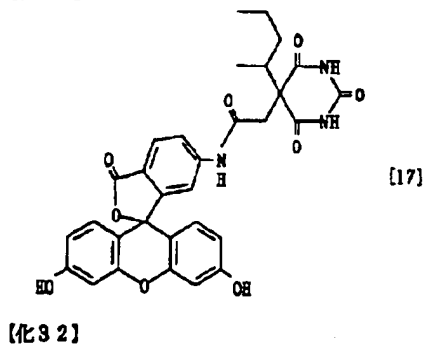
特開平4-231873



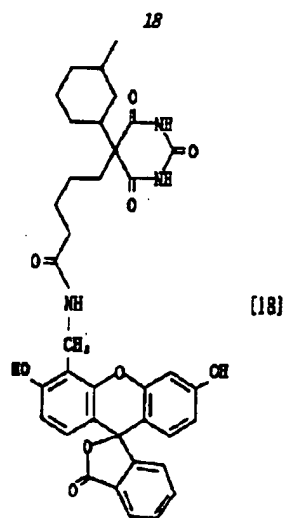
【化30】



【化31】



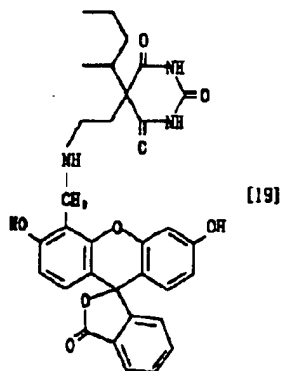
【化32】



10

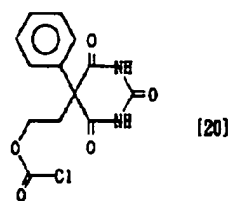
【化33】

20

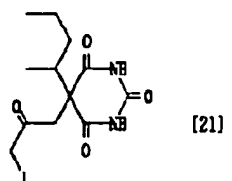


30 は、本発明に係るトレーサーの各種具体例の構造式を示す。式：

【化34】

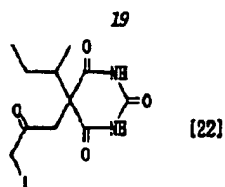


40 【化35】

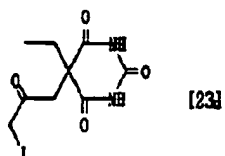


【化36】

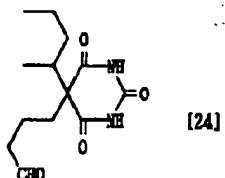
(11)



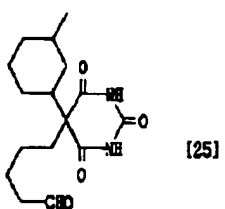
【化37】



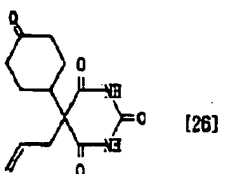
【化38】



【化39】

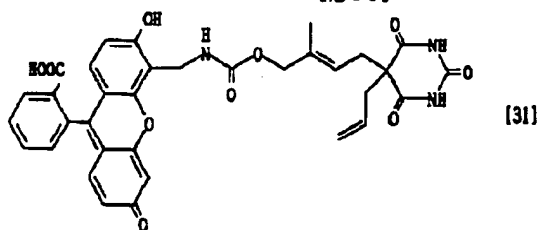


【化40】



は、本発明で用いる免疫抗原の形成に使用するハプテン
反応体の各種具体例の構造式を示す。式：

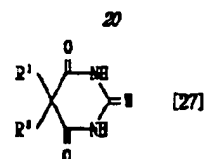
【化41】



は、本発明の好ましいトレーサーを示す。

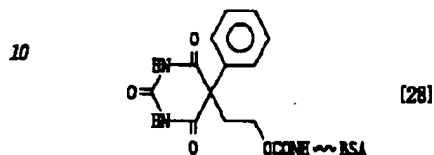
【0022】本発明は、フルオレセインおよびフルオレ
セイン誘導体の使用を要する。特に、本発明のトレーサ
ー化合物の有用性に対してフルオレセインおよびその誘

*



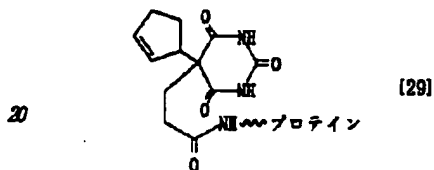
は、本発明のトレーサー並びに該トレーサーの製造に用
いる各種反応体の一般構造式を示す。式：

【化42】



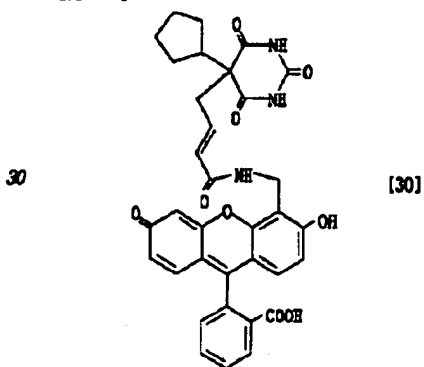
は、本発明の好ましい免疫抗原を示す。式：

【化43】



は、本発明の最も好ましい免疫抗原を示す。式：

【化44】



は、本発明の最も好ましいトレーサーを示す。式：

【化45】

導体の必要な性質は、フルオレセインの蛍光である。フ
ルオレセインは式【3】で示されるように、環状の酸濃
度(pH)に基いて2つの互変異性体で存在する。開環
(酸)型において、多数の共役二重結合が存在し、開環型

のフルオレセイン(およびフルオレセイン成分を含有する化合物)は、約 4×10^{-1} 秒の励起状態寿命後に、ブルー光を吸収し、かつグリーン蛍光を発することが可能となる。開環型と閉環(ラクトン)型が共存すると、開環および閉環型の分子の相対濃度は、pHレベルの調整によって容易に変えられる。一般に、本発明のトレーサー化合物は、生理学的に許容しうる塩(たとえばナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等)の溶液で存在することにより、本発明の分析法で使用する場合、開環蛍光型で存在することが可能となる。存在する特定の塩は、pHレベルの調整に用いる緩衝剤に左右される。たとえば、リン酸ナトリウム緩衝剤が存在すると、本発明のトレーサー化合物は一般に、ナトリウム塩の開環型で存在する。

【0023】なお、本明細書において個々の化合物またはより大なる化合物の成分として用いる語句“フルオレセイン”は、蛍光の点を除き、個々の分子に存在する場合、開環および閉環型の両方を含むことを意味する。開環型は蛍光を起す上で必要である。

【0024】フルオレセイン分子の炭素原子の番号付けは、該分子の開環型または閉環型のいずれを考慮するかによって変化する。すなわち、フルオレセインおよびその化合物に関する文献において、炭素原子の番号付けは一定していない。開環型において、フェニル環上のラクトンのカルボニルに対しパラ位の炭素の番号は6である。閉環型において、フェニル環上のカルボン酸基に対するパラ位の炭素の番号は5である(式[3]参照)。この開示において、開環型での番号付けを採用するが、それは合成に用いられる原料が最も一般的、かかるシステムで番号付けされているからである。従って、フルオレセインおよびその化合物のカルボキシル基と反対側の炭素原子の番号を“6”とする。

【0025】抗体と複合しない溶液状態のトレーサーは、蛍光の吸収および再発射に必要な時間より少ない時間で自由に回転しうる。その結果、再発射した光は比較的ランダムに配向するので、抗体と複合しないトレーサーの蛍光偏光は低く、ゼロに近づく。特定抗体と共に複合すると、形成されるトレーサー-抗体錯体は、比較的小さなトレーサー分子より遅い、抗体分子の回転を装うことにより、偏光の増大が観察される。従って、リガンドが抗体部位に対しトレーサーと錯合するとき、得られる自由トレーサーとトレーサー-抗体錯体の混合物の蛍光の観察される偏光は、トレーサーの値とトレーサー-抗体錯体の値の中間値を呈示する。試料が高濃度のリガンドを含有する場合、観察される偏光値は自由トレーサーの値に接近、すなわち低くなる。試験試料が低濃度のリガンドを含有する場合は、偏光値は結合トレーサーの値に接近、すなわち高くなる。免疫学的検定の反応混合物を、垂直そして水平に偏光する光で連続的に励起し、次いで発射光の垂直成分のみを分析することにより、反

応混合物中の蛍光の偏光を正確に測定することができ、測定されるリガンドの偏光と濃度の明確な関係は、キャリブレーションの偏光値を公知濃度のリガンドで測定することによって確立される。試料中のリガンド濃度は、この方法で作成した標準曲線から外挿することができる。

【0026】本発明によって形成される特定の抗体およびトレーサーは、極めて良好な検定法をもたらすことがわかった。

【0027】本発明の記載に先立って、広範なバルビツレート特異性を持つ免疫学に基づく診断試験を開発する問題(すなわち、式[1-1~6]で示されるような一般使用のバルビツレートに対し、免疫学的検定法で用いられ、かつリガンドおよびトレーサーに対し特異的な抗体の特異性の欠如またはより不均一なクロス反応性)は、1つのバルビツレートに対してそれぞれ特効薬である数種の抗血清を患者の試料と混合することにより解決された。しかし、この異なるバルビツレート特異性を持つ抗体の混合によって、感度が低く、クロス反応性が乏しく、かつロットからロットの抗血清ブレンドの変異性が大きいという重大な欠点を持つ検定法をもたらす。

【0028】本発明は上記問題を解決した。驚くべきことに、広範なバルビツール特異性を持つ免疫学に基づく診断試験の開発は、免疫複合環境において、たった1つのバルビツール構造に対し産生するモノクローン性または多クローン性抗体を、適当なトレーサー(蛍光-標識バルビツレート誘導体)との組合せで使用した場合に可能であることがわかった。最適な組合せは、免疫抗原と5員環構造を含有するトレーサーであることがわかった。本発明の検定法において、この広範なバルビツレート特異性は、抗血清中に含有される抗体を産生するのに用いるトレーサーおよび免疫抗原を以下の条件を満足するよう設計することによって達成される。すなわち、(1)トレーサーおよび免疫抗原は共に、一般使用のバルビツレートに類する化学構造を有すること、および(2)抗血清中に含有される抗体は、トレーサーに対し特異的であるよりはむしろクロス反応性を示し、このためトレーサーとの結合親和力が小さく、抗体とトレーサーの結合の置換を可能ならしめること。試料中の各種バルビツレートは、同様に抗体からトレーサーを置換する能力を有するため、一般使用の各種バルビツレートのためのより等価な検出システムがもたらされる。広範なバルビツール特異性を持つ免疫学に基づく診断試験をもたらす、抗体とトレーサーのいずれの組合せも、全く予測しえるものではない。すなわち、他の組合せではなく上記組合せを必然的に伴う一定の実験から得られる有利な結果は、全く予想外のものである。

【0029】従って、本発明の方法は以下の点で、当該分野で記載の関連技術とは著しく相違する。すなわち、免疫学検定法の免疫学試薬の多特異性は一般に該検定法

の2つの重要な免疫学試薬(トレーサーおよび抗体)を産生するのに、2種のバルビツレート誘導体を使用することによって達成される点である。本発明は、広範なバルビツレートに対し同等に反応する異常な能力を有する。より等価なバルビツレート検出システムを提供する。加えて、本発明は、数種の免疫学試薬の混合から生じる上記免疫学反応性に関して、当該分野で記載の検定法の不確実性を解消する。さらに、本発明の免疫学的検定法の広い特異性は、現在市場に出ており、かつ生物学的試料のバルビツレートを検定するキットに含まれる、検定法の特異性より優れている。すなわち、本発明の免疫学的検定法は、当該分野で記載の方法あるいは社会一般に公開される他の方法と比べて、より迅速でかつ正確なバルビツレート検定法を付与するが、その理由は以下の通りである。

- (1)分析前に検体処理の必要がないこと、
- (2)広スペクトルのバルビツレート特異性を有すること、
- (3)抗体特異性はバルビツレートに類する化合物以外の実質的全ての化合物の検出を阻止するため、試料中の1種以上のバルビツレートの存在を正確に測定すること、
- (4)一般使用のバルビツレート間のクロス反応性が乏しいため、高濃度過大評価に基づき確認できないバルビツレート濃度を持つ試料の別途分析を阻止すること、および
- (5)不均質な免疫学的検定操作と異なる均質な検定法であって、最終値光表示数値を読む前に、結合トレーサーを未結合トレーサーから分離する必要がないこと。

【0030】このように、本発明の免疫学的検定法は特に、以下の点で有利である。すなわち、当該分野で記載の問題(低感度、乏しいクロス反応性、および抗血清ブレンドのロットからロットの広い変異性)を有することなく、身体流体中の広範なバルビツレート薬物を検出するのに使用しうる点である。かかる免疫学的検定法は、スクリーニング検定の使用が望ましい。何故なら、バルビツレートスクリーニング検定において、使用する抗体をバルビツレートに類するどの化合物にも同等に反応させることが望しく、かつ当該検定法が法医学、臨床医学および産業界において広い適用性を有するからである。

【0031】試薬および試薬キット

本発明の免疫抗原およびトレーサーは共に、前記の一般構造式で示すことができる。試料中のバルビツレートの存在またはその量を測定する本発明の新規方法の目的は、抗体の認知部位に対しバルビツレートとトレーサーを競合させることである。この目的達成において、ヘプテンおよびトレーサーの構造における大きな変動が可能となる。本発明の目的において、“ヘプテン”は免疫抗原の前駆体であって、一般に、免疫学的活性な抗体に結合するのに適当な基を持つ置換バルビツレート誘導体からなる。

【0032】生物学的流体中のバルビツレートの存在またはその量を測定する本発明の新規な試薬キットは、前記式[27](式中、W、R¹、R²、F¹およびR⁴は前記と同意義)の第1トレーサーの塩、および前記式[2](式中、W、R¹、R²、QおよびRは前記と同意義)の構造を有する免疫抗原に対して産生する単クローン性または多クローン性抗体を包含する。一般に、抗体は一般使用のバルビツレートに類する構造を持つ免疫抗原に対して産生し、トレーサーは一般使用のバルビツレートに類する構造を有するが、免疫抗原の構造に類しない構造を有する。好ましくは、試薬キットはリボフラビンによる蛍光干渉を減少させるのに有効量のリボフラビン結合プロテインをも含有する。試薬キットでの使用に最も好ましいトレーサーは、前記式[30]のトレーサーであるが、試薬キットでの使用に最も好ましい抗体は、前記式[29]の免疫抗原に産生する抗体である。試薬キットでの使用に最も好ましいトレーサーと抗血清の組合せは、前記式[30]のトレーサーと前記式[29]の免疫抗原に対して産生する単クローン性または多クローン性抗体の組合せである。

【0033】免疫抗原の構造

使用できる抗体は、多種のバルビツレート誘導体から産生することができる。環上の5位に官能基を持つ化合物から作られる免疫抗原は、動物の抗体を産生することができ、かかる抗体は適当なトレーサーと組合せることにより、本発明に係るバルビツレート検定法で用いられる。

【0034】本発明の免疫抗原は、前記式[2]の一般構造式で示され、本発明の好ましい型において、免疫抗原は前記式[2]の一般構造式からも誘導される。本発明の最も好ましい免疫抗原は、前記式[29]で示される。免疫抗原は、下記合成法および実施例の記載から説明されるように、前記式[2]の化合物をポリ(アミノ酸)もしくはポリ(アミノ酸)誘導体または他の免疫抗原的に活性な担体とカップリング反応させることによって製造することができる。

【0035】本発明の免疫抗原の最も好ましい型において、使用するポリ(アミノ酸)はサイログロブリンであるが、アルブミン類、血清プロテイン、たとえばグロブリン類、接眼レンズ(ocular lens)プロテイン、リボプロテインなどを含む各種のプロテイン担体を使用しうることを理解すべきである。プロテイン担体の具体例としては、サイログロブリン以外に、チロキシン結合グロブリン、牛血清アルブミン、キーホールかさ貝(keyhole limpet)ヘモシアニン、卵オボアルブミン、牛ガンマグロブリン等が挙げられる。別法として、アスパラゲートなどの、十分な数の有効カルボキシレート基を有する合成ポリ(アミノ酸)を使用することができ、同様に反応性官能基を持つ他の合成または天然ポリマー物質も使用でき

【0036】本発明の免疫抗原のほとんどは、免疫抗原的に活性な担体にハプテンを結合させる、 $-\text{CH}_2-$ 、*

O

I

$-\text{OCNH}-$ 基を有し、かかる結合基はペプチド結合基とは異なるもので、変化

しやすいRを前記式[2]の化学式の変化しやすいQへ直接結合させる。当該分野で公開されていないこれらの免疫抗原の1つの利点は、本発明の免疫抗原の免疫抗原的活性担体成分へ、免疫抗原のハプテン成分を直接結合させる非ペプチド結合が極めて安定であることである。すなわち、本発明の免疫抗原は、たとえばヤマオカらの「J. Immunological Methods」(28, 51, 1979年)に記載の免疫抗原より安定である。ヤマオカらが記載するペプチド結合とは異なり、本発明の多くの新規免疫抗原で採用する結合基は、生物学的環境における加水分解に対する感受性が著しく少ない。たとえば、前記式[21]、[22]および[23]に官能基を持った新規ハプテンが示されており、かかるハプテンはヨードアセタミドの基を含有し、かつ塩基性pHにて、免疫抗原的活性担体にカップリング反応することができ、これによって非ペプチド結合が形成される。また前記式[24]、[25]および[26]のそれぞれに示されるハプテンは、還元アミノ化法によって、免疫抗原の活性担体にカップリング反応することができ、この結果、非ペプチド結合が形成される。

【0037】本発明の好ましい免疫抗原は、前記式[28]の構造を有する。本発明の最も好ましい免疫抗原は、前記式[29]で示される。

【0038】トレーサーの構造

本発明のトレーサーの構造の可能な変動は、ハプテンの構造の可能な変動と比べてはるかに大きい。本発明のトレーサーは、前記式[27](式中、W, R¹, R², F1およびR⁴は前記と同意義)の一般構造式で示される。本発明の好ましい型において、トレーサーは前記式[5]~[31]のいずれかの構造式で示される。本発明の最も好ましいトレーサーは、前記式[30]で示される。

【0039】トレーサーは、たとえば前記式[4-1~12]で示されるアミノ、アミジノ、トリアジニルアミノ、カルバミド、チオカルバミド、カルバモイル、チオカルバモイルまたはスルホニルカルバモイル基によって、フルオレsein誘導体に結合するバルビツレート誘導体である。トレーサーは、下配合成分および実施例の記載から説明されるように、アミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、メルカプト基、ヒドロキシル基、イミデート基、ヒドラジド基、イソシアネート基、チオイソシアネート基、クロロホルメート基、クロロチオホルメート基、カルボン酸クロリド基、クロロスルホニルカルバモイル基などを含有するバルビツレート誘導体に、適当なフルオレsein誘導体を結合させることによって製造される。

*-CH=または

【0040】具体例として、以下に示すフルオレsein誘導体のいずれかを使用することができる。

F1-CH₂-NH₂, アミノメチルフルオレsein

F1-NH₂, フルオレseinアミン

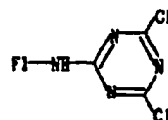
F1-CO₂H, カルボキシフルオレsein

F1-NHCOCH₂I, α-ヨードアセタミドフルオレsein

F1-NHCOCH₂Br, α-ブロモアセタミドフルオレsein

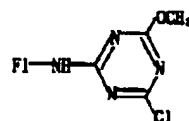
式:

【化46】



の2,4-ジクロロ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノフルオレsein(DTAF)式:

【化47】



の4-クロロ-6-メトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノフルオレsein

F1-NCS, フルオレseinチオイソシアネート

【0041】本発明の新規トレーサーにおける、フルオレsein成分とバルビツレート環部間の炭素-炭素二重結合の存在は、抗体との最適相互作用となるようトレーサーを有利に配向することが、予想外にもわかった。すなわち、本発明のトレーサーは、トレーサーのフルオレseinとリガンド成分間にエチレン($-\text{CH}=\text{CH}-$)結合基を有することにより、以下に示す2つの予期しえない有利な特性を具備する。

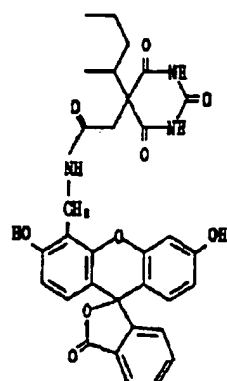
(1)安定性が大きいこと、および

(2)トレーサーのフルオレsein(またはフルオレsein誘導体)とリガンド成分間の相互作用が減少する結果、抗体への結合力が増大すること。

【0042】本発明のトレーサーが結合基の二重結合に基づき、驚くべき安定性に高いという最初の特性は、下記表1に示すデータによって証明される。

表1

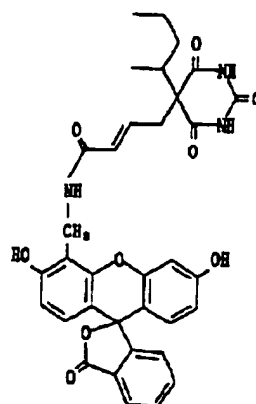
【表1】

バルビツレート トレーサー	温度 (°C)	日数	偏光値(緩衝剤)	偏光値(有機酸)
		0	247.79	269.39
	2-8	1	238.09	271.12
	2-8	7	168.21	228.62
	45	1	48.70	62.68
	45	7	>48.70	>62.68

(エチレン結合基なし)

表1(つづき)

20 【表2】

バルビツレート トレーサー	温度 (°C)	日数	偏光値(緩衝剤)
		0	239.63
	2-8	1	235.18
	2-8	7	235.08
	45	1	237.93
	45	7	239.72

(エチレン結合基あり)

【0043】上記表1のデータによれば、トレーサーの 40 上)。

フルオレseinとリガンド成分間にエチレン(-CH=CH-)結合基を有するトレーサー(表1つづき)は、かかるエチレン結合基を欠くトレーサー(表1)と比べ、各種の温度での安定性がかなり大きいことが認められる。エチレン結合基を含有するトレーサーの安定性は、2~8℃および45℃の両温度において、1日目と7日目とではほぼ同等であるが、かかるエチレン結合基を欠くトレーサーでは、2~8℃の温度において7日目には安定性が30%減少し、しかも温度45℃における7日目では、実質的に全ての結合能力を失う(偏光値の80%以 50

【0044】二重結合を欠く化合物は約12時間の寿命を有するため、合成後12時間で不安定となるが、二重結合を含有する化合物では、かなり長い期間にわたって安定のままで存在する。下記表2(a)および2(b)に示すデータによれば、トレーサーのフルオレseinとリガンド成分間にエチレン(-CH=CH-)結合基を有するトレーサーは、各種の温度において、少なくとも1年および1年半にわたって安定のままで存在しうることが認められる。なお、表2(a)に示すデータを作成するのに、前記式[5]の化学構造を持つトレーサーを使用し、一

方、表2(b)に示すデータを作成するのに、前記式[3 *あることが認められる。
0]の化学構造を持つトレーサーを使用した。これらの [0045]
データから、当該トレーサーは長期間にわたって安定で*

表2(a)

期間	温度(℃)	偏光値	平均純強度
0日	2-8	209.17	3400-6000
1日	2-8	206.61	3290-4733
2日	2-8	207.07	3200-4670
3日	-20	207.38	3395-4965
	2-8	208.05	3387-4895
	37	207.60	3400-4910
	45	205.51	3400-4950
1週間	-20	208.46	3300-4800
	2-8	208.26	3400-4900
	37	202.78	3500-5000
	45	200.11	3550-5200
2週間	-20	208.85	3180-4635
	2-8	210.41	3100-4590
4週間	2-8	210.35	3395-4988
2ヶ月	2-8	207.21	3282-4777
4ヶ月	2-8	205.59	3210-4775
8ヶ月	2-8	206.85	3150-4677
1年	2-8	204.85	3161-4615
18ヶ月	2-8	199.29	3304-4798

表2(b)

期間	温度(℃)	偏光値	平均純強度
0日	2-8	177.29	2686
1日	2-8	177.23	2732
2日	2-8	178.32	2698
3日	-20	178.48	2706
	2-8	176.45	2664
4日	37	176.53	2649
	45	176.56	2690
1週間	2-8	178.69	2705
	37	180.02	2710
	45	175.96	2681
2週間	2-8	178.01	2642
	37	179.81	2652
	45	172.69	2760
4週間	2-8	184.16	2669
2.5ヶ月	2-8	176.47	2692
4ヶ月	2-8	175.53	2665
6.5ヶ月	2-8	176.90	2741
9ヶ月	2-8	174.34	2816

【0046】二重結合を含有する化合物に関し、かかる二重結合を欠く化合物と比較しての第2の重要な利点がある。二重結合を含有しない化合物の場合、該化合物のフルオレセイン(またはフルオレセイン誘導体)とリガンド成分間かなりの相互作用が起り、免疫学的検定法において抗体に対し結合するリガンド成分の能力が損うと

いう不都合な結果となる。これに対し、二重結合を含有する化合物は結果的に厳正な立体化学を具備する。すなわち、フルオレセイン(またはフルオレセイン誘導体)とリガンド成分間に相互作用はほとんどなく、免疫学的検定法においてリガンド成分は抗体に対し自由に結合する状態となる。

【0047】抗体

本発明の抗体は、上記免疫抗原に対する羊の応答を喚起することによって製造される。当業者にとって周知の方法で、動物またはインビトロ培養の免疫反応細胞に免疫抗原を一連の接種で投与する。理解すべき点は、本明細書で詳述する実験において、バルビツレート免疫抗原に対し羊が好ましい免疫性宿主であるが、上述の化学構造に抗体を産生しうるインビボまたはインビトロ宿主も使用できることである。本発明の最も好ましい抗体は、前記式[29]の免疫抗原に対し産生する抗体である。

【0048】免疫抗原の合成

本発明の免疫抗原は、前記式[2]（Xがクロロホルメート、アルデヒド、カルボキシル、アミノ、クロリド、プロミド、ヨージドまたはヒドロキシのとき）の一般構造式で示されるようなハブテンを、ポリ（アミノ酸）または他の免疫抗原的活性担体にカップリング反応させることによって作られる。ポリ（アミノ酸）または他の担体成分はハブテンに対し、カルバメート、アミド、チオエーテル、エーテル、ジアゾまたはアミノ結合基によって結合させることができる。最も好ましい具体例において、ポリ（アミノ酸）はサイログロブリンで、免疫抗原は前記式[29]の構造を有する。

【0049】免疫抗原は、アルデヒド、カルボキシル、アミノ、塩素、臭素、ヨウ素、ヒドロキシドまたはヨードアセトニル基を含有するハブテンを、ポリ（アミノ酸）または他の免疫学的活性担体にカップリング反応させることによって製造される。アルデヒドは、ポリ（アミノ酸）または他の免疫学的活性担体のアミノ基と共にシッフ（Schiff）塩基を形成することにより、カップリング反応を行うことができる。シッフ塩基を直ぐにシアノホウ水素化ナトリウムで還元して、安定なアミノメチル結合基を形成する。ポリ（アミノ酸）のカルボキシル基の活性化は、ハブテンおよびポリ（アミノ酸）を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、メチル-γ-トルエンシルホネートなどと混合することにより行うことができる。ヒドラジドの場合は、非芳香族アミノの場合と同様な方法でカップリング反応を行う。アルキル、クロロ、プロモおよびヨード誘導体とシルホネートエステルは、強アルカリ性条件下でチロシン残基のフェノール性ヒドロキシル基をアルキル化して、アルキルアリアルエーテルを形成し、またシステインの遊離スルフヒドリル基の硫酸をアルキル化してチオエーテルを形成する。これらの反応において、好ましい誘導体はヨードアセトニルおよびヨージド類である。

【0050】上記ハブテン（免疫抗原前駆体）の合成は、2つの一般法の一つで行う。前記式[2]に、本発明方法の好ましい具体例に係る免疫抗原前駆体が示されてい

る。この製法は、適当な置換マロネートまたはシアノアセテートエステルを、保護されたアルコール官能基を有するプロモアルキルアルコール、好ましくはテトラヒドロピラニルアルコールでアルキル化することにより進行する。かかる中間体を尿素で環化するには、上記反応体の隣接重合物を、マグネシウムメトキシド、マグネシウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、またはカリウム-tert-ブトキシドなどの塩基で処理することによって行うことができる。保護された官能基を暴露し、化合物をポリ（アミノ酸）または他の担体にカップリング反応させる。

【0051】免疫抗原の5-ヨードアセトニルバルビツレート前駆体は、末端二重結合を持つ5-アルケン基を有する、適当な5,5-ジ置換バルビツレート（前記式[2]）を、ヨージド/水と反応させることによって製造される。この方法で、3-ヒドロキシ-ヨードバルビツレートを製造する。対応するα-ヨードアセトニルバルビツレートは、これらの化合物をクロム系酸化剤（たとえばジョーンズ試薬など）で酸化することによって得られる。

【0052】末端二重結合を有する適当な5-アルケニルバルビツレート（前記式[2]）をメタノール中、-78℃にてオゾン分解することにより、アルデヒドを製造することができる。アルデヒド（前記式[2]）を得る他の好ましい方法は、適当な置換マロネートエステルまたはシアノアセテートエステルを、好ましくはアセタルとしての、保護されたアルデヒド官能基を有するプロモアルキルアルデヒド反応させることによる。かかる中間体を尿素で環化するには、上記反応体の隣接重合物を、ナトリウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、カリウムメトキシド、またはカリウム-tert-ブトキシドなどの塩基で処理することによって行うことができる。保護された官能基を暴露し、化合物をポリ（アミノ酸）または他の担体にカップリング反応させる。

【0053】適当なアルデヒドをクロム系酸化剤（たとえばジョーンズ試薬など）で酸化することにより、カルボン酸を得る。カルボキシアリルバルビツレートまたはカルボキシアリルバルビツレートの好ましい合成法は、適当な5-置換バルビツレート（前記式[2]）をトリエチルアミン、水素化ナトリウム、カリウム-tert-ブトキシドなどの塩基の存在下、ハロゲンアルキルエステルまたはハロゲンアルケニルエステルと反応させた後、適当なバルビツレートエステルを濃硫酸、40%硫酸などの酸で加水分解することによる。

【0054】アルキルハライドは、アルコールを塩化水素、臭化水素またはヨウ化水素で処理するか、あるいは塩化チオニルなどのハロゲン化試薬で処理することにより製造することができる。これらのハライドは、比較的中性条件下で直接、遊離スルフヒドリル基または担体に、または強塩基性条件下でポリ（アミノ酸）のチロシル

残基などにおけるようなフェノール類にカップリングする。

【0055】トレーサーの合成

本発明の2つの好ましいトレーサーの構造は、前記式[5]および[31]に示される。本発明の最も好ましいトレーサーの構造は、前記式[30]に示される。

【0056】本発明のトレーサーは、フルオレセイン成分またはフルオレセイン誘導体を、前記式[27]（式中、 $W, R^1, R^2, F1$ および R^4 は前記と同意義）の一般構造にカップリング反応させることによって作られる。

【0057】フルオレセイン成分は、前記式[4-1~12]で示されるアミド、アミン、尿素、チオ尿素、カルバメート、チオカルバメート、トリアジニルアミノまたはスルホニルカルバメート結合基によって、アミノ、カルボキシル、アルデヒド、酸クロリド、イミデートまたはアルコキシ官能基に結合させることができる。好ましい具体例において、フルオレセイン誘導体はアミノメチルフルオレセインであって、これを前記式[27]（式中、 R^1 は（メチル）ブチルまたは1-メチルプロピルおよび R^2 は $-CH_3$ 、 $-COOH$ または $-CH_2-CH=CH-CO_2H$ である）で示される前駆体にカップリング反応させる。最初に、バルビツレートのカルボン酸を用いて混合無水物を形成することにより、適当なカルボキシアルケニルバルビツレートをアミノエチルフルオレセインにカップリング反応させる。混合無水物はイソブチルクロロホルムを用いて製造される。好ましい方法では、ジメトキシエタンを用いる。

【0058】他の活性化基、たとえば酸クロリド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、および2-エチル-5-フェニルイソキサゾリウム-3'-スルホネートを使用でき、また他の溶剤、たとえばテトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、およびヘキサメチレンホスホルアミドを使用できる。反応体はアミド結合を形成する条件下でカップリング反応させることが好ましく、また混合無水物法を用いることが最も好ましい。使用できるトレーサーは、各種のバルビツレートから製造することができる。

【0059】アミノ、ヒドラジニル、ヒドラジドなどの末端アミノ基を有する全てのバルビツレートを、活性エステル法または混合無水物法によりカルボキシルフルオレセインにカップリング反応させ、また単に両物質を溶液状態で混合することによって、フルオレセインイソチオシアネート、DTAF、またはアルコキシDTAFにカップリング反応させる。アミノ基は、ホスゲンまたはチオホスゲンと反応させることにより、それぞれイソシアネート基またはチオイソシアネート基に変換することができる。次いでこれらをアミノメチルフルオレセインと縮合して、トレーサーを製造する。

【0060】末端アルデヒド基を有する全てのバルビツ

レートと、ホウ素系ナトリウムによる還元アミノ化でアミノメチルフルオレセインにカップリング反応させる。

【0061】末端ヒドロキシル基を有する全てのバルビツレートを、ホスゲンと反応させた後、溶液状態のアミノメチルフルオレセイン、DTAF、 α -ヨードアセタミドフルオレセイン、 α -プロモアセタミドフルオレセイン、またはフルオレセインイソチオシアネートと反応させることにより、フルオレセインにカップリング反応させることができる。5-ヨードアセトニル基を有する全てのバルビツレートをアミノメチルフルオレセインにカップリング反応させて、トレーサーを製造する。

【0062】注目すべき点は、本発明の観点の中に、フルオレセイン成分とバルビツレート間の炭素-炭素二重結合の存在が、抗体との最適相互作用が得られるようにトレーサーを配向させるといった知見が含まれることである。

【0063】検定法

本発明の個々のトレーサーおよび抗体は、バルビツレートの蛍光偏光検定法において驚くべき良好な結果をもたらすことがわかった。

【0064】前記式[1-1~6]に、本発明に従って定量的または定性的に測定されるバルビツレートの幾つかの一般構造が示されている。

【0065】本発明の検定法は、分析前にいかなる検体処理も必要とせず、かつ該検定法によって広範なスペクトルバルビツレート特異性が示されることから、従来法のほとんどと比べて、より迅速かつ正確なバルビツレート検定法を付与する。かかる検定システムは試料中のバルビツレートの存在を正確に測定するが、それは抗体特異性がバルビツレート類似化合物以外のほとんどの化合物の検出を阻止するからである。

【0066】本発明の生物学的流体中のバルビツレートの存在またはその量を測定する新規な方法は、

(A) 試料を、前記式[2]（式中、 W, R^1, R^2, Q および R は前記と同意義）の構造を有する免疫抗原に体して産生する単クローン性または多クローン性抗体を含有するバルビツレート抗血清と、および前記式[27]（式中、 $W, R^1, R^2, F1$ および R^4 は前記と同意義）の構造を有し、バルビツレート抗血清の存在に対し検出する蛍光偏光応答をもたらすことができるトレーサー化合物と接触せしめる工程、

(B) 工程(A)から得られる溶液に平面偏光を通して、蛍光偏光応答を得る工程、次いで

(C) 工程(B)の溶液の蛍光偏光応答を、試料中のバルビツレートの存在またはその量の測定として検出する工程から成る。

【0067】この方法の最も好ましい型では、前記式[29]の構造を有する免疫抗原に対して製せられる単クローン性または多クローン性抗体を、前記式[30]の構

造を有するトレーサーと共に使用する。しかしながら、これらの抗体と共に使用する他の好ましいトレーサーは、前記式[31]の構造を有するトレーサーである。

【0068】本発明の分析法、すなわち、本発明のトレーサー化合物および免疫抗原を用いる蛍光免疫学的検定法によってバルビツレートと測定する方法によれば、バルビツレートと含有するまたはバルビツレートと含有しているのではないかとと思われる試料を、トレーサーの生理学的に許容しうる塩およびバルビツレートに対し特異的な抗体と混合する。抗体は上述の免疫抗原を用いて製造される。バルビツレートとトレーサーは取られた抗体結合部位で競合する結果、錯体が形成する。トレーサーおよび抗体の濃度を一定に維持することにより、バルビツレート-抗体錯体と形成されるトレーサー-抗体錯体の比率は、試料中のバルビツレートの量は正比例する。従って、混合物を平面偏光で励起し、次いでトレーサーおよびトレーサー-抗体錯体によって発せられる蛍光の偏光値を測定すると、試料中のバルビツレートの存在を測定することができる。

【0069】結果は、純ミリ偏光単位およびスパン(ミリ偏光単位において)の観点から定量化することができる。純ミリ偏光単位の測定は、バルビツレートの非存在下、最大量のトレーサーが抗体に結合したとき、最大偏光を表示する。純ミリ偏光単位が高くなればなるほど、抗体に対するトレーサーの結合がよくなる。スパンは、トレーサーがバルビツレートの非存在下で抗体に対し最大に結合したときの純ミリ偏光と、トレーサーが明示濃度のバルビツレートの存在下で抗体に対し結合したときの純ミリ偏光との較差である。最大スパンは、当該検定法が検出しうるリガンド濃度の範囲を規定する。大きなスパンは、データの良い数値的分析をもたらす。好ましい抗体-トレーサー組合せは、少なくとも80ミリ偏光単位のスパンを有する。小さなスパンは、各環境に応じて許容することができる。

【0070】本発明方法を実施するときのpHは、トレーサーのフルオレセイン成分を開環型で存在せしめうるのに十分なpHでなければならない。pHは通常約3~12、より一般的には約5~10、最も好ましくは約6~9の範囲であってよい。種々の緩衝剤を用いることにより、検定操作中のpHを維持することができる。代表的な緩衝剤としては、ボレート、ホスフェート、カーボネート、トリス(tris)、バルビタールなどが挙げられる。本発明にとって、特定緩衝剤の使用に限定されるものではないが、トリスおよびホスフェート緩衝剤が好ましい。緩衝剤のカチオン部は一般に、溶液状態のトリス塩のカチオン部を決定する。

【0071】試料中に存在するリボフラビンに結合して、リボフラビン結合タンパク質(RBP)-リボフラビン錯体とするため、試料または1種以上の検定試薬へRBPを加えて、リボフラビンによる潜在的な蛍光干渉を

削除してもよい。RBPはM. W. (分子量)約32000のプロテインで、通常卵白から単離される。卵白から単離すると、RBPの各分子は1分子のリボフラビンを含有する。このホロプロテイン型のRBPは、酸性条件下の透析でアポプロテイン型に変換して、結合リボフラビンを除去しなければならない。本発明で用いるRBPアポプロテインは、ミズーリ州セントルイス市のシグマ・ケミカル・カンパニーから商業上入手可能である。使用量に制限はないが、試料中の実質的に全ての遊離リボフラビンを結合させるのに十分な量を条件とする。

【0072】以下、本発明の好ましい改良した検定法について、詳しく説明する。この検定法は「均質検定法」であって、結合トレーサーと未結合トレーサーを分離していない溶液から最終偏光値を読み取ることを意味する。このことは、数値の読み取り可能前に未結合トレーサーから結合トレーサーを分離しなければならないような、不均質免疫学的検定法にない優れた別個の利点である。

【0073】本発明の蛍光偏光検定法に用いる試薬は、バルビツレート用抗体とバルビツレートトレーサーから成る。付加的に、予備処理溶液、希釈緩衝剤、バルビツレートキャリブレーションおよびバルビツレート対照を含む極めて通常の溶液の調製が望まれる。これらの試薬の代表的溶液の幾つかは以下に記載され、かつイリノイ州アボット・パークのアボット・ラボラトリーズから検定用「キット(kit)」で商業上入手することができる。

【0074】本発明の最も好ましい検定法の場合、本明細書で示す全ての百分率は、他に特別明示しない限り重量/容量である。現時点で好ましいトレーサー配合は、pH 6.2の0.1モルホスフェート緩衝剤、5%5-スルホサリチル酸ナトリウム、0.1%ナトリウムアジド、および0.01%牛ガンマグロブリンの150ナノモルトレーサーである。抗血清配合は、pH 7.5の0.1モルトリス緩衝剤、0.1%ナトリウムアジド、0.1%牛ガンマグロブリンおよび2%エチレンジグリコール(v/v)で希釈した羊血清から成る。希釈緩衝剤は、pH 7.5の0.1モルリン酸ナトリウム、0.1%ナトリウムアジドおよび0.01%牛ガンマグロブリンから成る。予備処理溶液は、0.01%牛ガンマグロブリン、pH 7.5の0.1モルトリス緩衝剤、0.1%ナトリウムアジドおよび10mg/mlリボフラビン結合タンパク質から成る。バルビツレートキャリブレーションは、濃度0.0、200、400、700、1200、および2000ナノグラム/mlの正常なヒトの尿中のセコバルビタールから成り、保存剤として0.1%ナトリウムアジドが有用である。正常なヒトの尿中のセコバルビタールから成るバルビツレート対照は、濃度300、800および1500ナノグラム/mlで供給され、保存剤として0.1%ナトリウムアジドもまた有用である。

【0075】好ましい操作は特に、イリノイ州アボット

37

・パークのアボット・ラボラトリーズから共に入手しうる、アボット・TDx(登録商標)クリニカル・アナライザー(Clinical Analyser, 臨床分析器)やアボットADx(登録商標)ドラッグス・オブ・アブュース・システム(Drugs of Abuse System, 乱用系の薬物)と共に使用できるようになっている。最小50 μ lの尿が必要である。TDxまたはADx試料カートリッジの試料容器の中へ直接、キャリブレータ、対照または未知試料をピペットで計量して入れる。この操作の利点の1つは、試料に特別な調製を要しないことである。この点から、本

【0076】手動で検定が行われている場合、試料を希釈緩衝剤中予備処理液と混合し、バックグラウンド値を読む。次いでトレーサーおよび抗体で試験液に混入する。培養後、蛍光偏光値を読む。

【0077】各キャリブレータ、対照または試料の蛍光偏光値を測定し、アボットTDxアナライザーなどの計器の出力テープにプリントする。非直線回帰分析を用い、各キャリブレータ対その濃度の偏光値をプロットすることにより、標準曲線を予め計器に生成しておく。記憶したキャリブレーション曲線から各対照または試料の濃度を読み、出力テープにプリントする。

【0078】上記好ましい操作に関し、注目すべき点は、トレーサー、抗体、予備処理液、キャリブレータおよび対照を約2~8℃に貯蔵し、一方、希釈緩衝剤を周囲温度で貯蔵すべきである。標準曲線および対照は2週間毎に処理し、各キャリブレータおよび対照は二回重複で処理すべきである。全ての試料を二回重複で処理することができる。

【0079】なお、理解すべき点は、上記本発明の詳細な説明および以下に挙げる実施例はあくまで例示であって、本発明の技術的範囲を限定するものではない。各種の改変は当業者にとって自明であり、従って、本発明の技術的範囲は特許請求の範囲およびその法的均等範囲のみによって制限されるものである。

【0080】

【実施例】実施例1~3は、本発明に従って行った実験を示す。実施例1~3および25は抗体の産生に用いる免疫抗原の製造に関し、実施例4~8は免疫抗原およびトレーサーの前駆体の合成に関し、および実施例9~24および26はトレーサーの製造に関する。なお、実施例24には本発明の最も好ましいトレーサーの製造が、また実施例25には本発明の最も好ましい免疫抗原の製造が記載されている。

【0081】実施例1

5-(1-メチルブチル)-5-(β -ヒドロキシ- γ -ヨードプロピル)バルビツール酸:5g(0.022モル)の5-(1-メチルブチル)-5-(アリル)バルビツール酸を180mlの水の中に、還流コンデンサー下で75~85℃に加熱し、反応混合物に6gのヨードを2時間に

38

わたって少量づつ加える。反応混合物を7時間攪拌加熱する。反応混合物を冷却して沈澱せしめる。結晶をブフナー漏斗で濾別し、水洗する。生成物をエタノール(50ml)より品出させて、5.57gの所望物質を得る。

【0082】5-(1-メチルブチル)-5-ヨードアセトニルバルビツール酸:1gの5-(1-メチルブチル)-5-(β -ヒドロキシ- γ -ヨードプロピル)バルビツール酸を75mlのアセトンに溶解する。10%硫酸中の重クロム酸カリウムの0.33モル濃液30mlを加える。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次いで200mlの酢酸エチルで抽出し、塩水、水で洗い、有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥する。酢酸エチルを減圧除去し、粗固体物質を70%エタノールより品出させる。無色結晶の所望生成物の収量519mg。

【0083】5-(1-メチル)ヨードアセトニルバルビツール酸と牛血清アルブミン(BSA)のカップリング反応:226mgのBSAを47mlのホスフェート(0.1M緩衝剤, pH8)および520 μ lのN,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解する。この溶液に、530mlのDMF中の152mgの5-(1-メチルブチル)-5-ヨードアセトニルバルビツール酸を加える。反応混合物を室温で36時間攪拌する。得られる溶液を水に対して徹底的に透析し、凍結乾燥して208mgの所望複合物(conjugate)を得る。

【0084】実施例2

1-プロモメチルテトラヒドロピラニルエーテル:氷浴で冷却した2-プロモエタノール(125g, 1.0当量)に、p-トルエンスルホン酸(触媒量)を加える。アルゴン雰囲気下攪拌しながら、ジヒドロピラン(93g, 1.1当量)を滴下する。滴下終了時、反応液を室温で1時間攪拌する。残渣を短路蒸留で精製して、約125gの生成物を得る。

【0085】フェニルテトラヒドロピラニルオキシエチルジエチルマロネート:DMF中のジエチルフェニルマロネート(76ml, 1.0当量)に、NaH(13.1g, 1.0当量, 64.14%鉱油分散体)を加える。反応液を50℃で0.5時間攪拌し、次いで1-プロモ-2-テトラヒドロピラニルエタノール(80ml, 1.5当量)を加え、反応液を60℃で18時間攪拌する。反応混合物を中和し、残渣を減圧除去する。残渣を短路蒸留で精製し、約46gの生成物を得る。

【0086】THP-ヒドロキシエチルフェノバルビタール:マグネシウム屑(3.7g, 1.2当量)をアルゴン雰囲気下、乾燥メタノールに溶解する。THP-マロネート(46g, 1.0当量)および尿素(9.9g, 1.3当量)をいっしょに乾燥メタノールに溶解し、次いでこれを上述のマグネシウム溶液に加える。48時間還流後、さらに尿素(9.9g, 1.3当量)とマグネシウムメトキシド(Mg3.7g, 1.2当量)を加える。さらに24時間還流後、残渣を除去し、残渣を5%HCl水

溶液に溶かし、次いでエーテルで抽出する。エーテル層から生成物を取り出し、エーテル/ヘキサンより品出させ、約13gの物質を得る。

【0087】5-フェニル-5-ヒドロキシエチルバルビツール酸:THP-ヒドロキシエチルフェノバルビタール(19g)を酢酸/水(50:50)に加熱下で溶解する。溶液を濃縮し、脱保護をTLC(シリカゲル、メタノール/塩化メチレン=10:90)で監視する。反応の終了時、溶媒を減圧除去し、残渣をエタノール/水より品出させる。白色粉末の生成物の収量8.7g。

【0088】5-フェニル-5-ヒドロキシエチルバルビツール酸とBSAの複合(接合)ヒドロキシエチルフェニルバルビタール(500mg)を乾燥した新蒸留THF(10ml)に懸濁する。溶液に攪拌下ホスゲン(15分間吹込んだ後、溶液にアルゴン(吹込み、過剰のホスゲンを除去する。15分後、THFを減圧除去し、残渣をエチルエーテルと共にトリチュレートする。乾燥後、白色粉末の生成物の収量約520mg。

【0089】0.1N(4H8)のホスフェート緩衝剤(7ml)中のBSA(500mg、1.0当量)の溶液に先ずD MF(3ml)を加え、次いで得られる溶液に、予めTHF(1ml)に溶解したヒドロキシエチルフェノバルビタールのクロロホルム(50mg)を加える。クロロホルムは激しく攪拌しながら加え、反応液をさらに3時間攪拌する。

【0090】溶液を、蒸留水で溶解するPIDカラムにて精製する。2つのピークを集め、最初のは100mgの生成物、2つ目は400mgの生成物を含有する。紫外線で調べると、両試料ともプロテインとフェノバルビタールを含有することがわかった。

【0091】実施例3

ジエチル-2-(1-メチルブチル)マロネート:ナトリウム金属(5.24g、0.23g原子)を25mlの無水エタノールと反応させる。この溶液に攪拌下、ジエチルマロネート(36.0ml、0.24モル)を滴下する。溶液を加熱還流し、2-プロモペンタン(29.0ml、0.23モル)を滴下する。一夜還流後、反応液を冷却し、エタノールを回転エバポレータにて除去する。生成物を水洗し、 $MgSO_4$ で乾燥し、分留して35.7gの所望生成物を得る。

【0092】ジエチル-2-(1-メチルブチル)-2-(5-ペンテニル)-マロネートカリウム金属(1.71g、0.04g原子)を30mlの無水1-ブチルアルコールと反応させる。次いで反応液を75℃に加熱し、ジエチル-2-(1-メチルブチル)-マロネート(10.03g、0.04モル)を滴下する。4時間還流後、攪拌しながら1-プロモ-5-ペンテン(6.4g、0.04モル)を滴下する。反応液を一夜還流し、次いで水に注ぎ、エーテルで抽出する。エーテル抽出物を $MgSO_4$ で乾燥し、エーテルを回転エバポレータにて蒸発させて、

所望物質を得る。

【0093】5-(1-メチルブチル)-5-(ペンテニル)-バルビツール酸:ナトリウム金属(0.98g、0.04g原子)をメタノール(15ml)と反応させた後、尿素(5.14g、0.09モル)を加える。次いでジエチル-2-(1-メチルブチル)-2-(5-ペンテニル)-マロネート(6.08g、0.02モル)を加える。2日間還流後、メタノールを留去する。残渣を1N水酸化ナトリウム溶液に溶解し、エーテルで抽出し、次いで塩酸で酸性化して、白色沈殿のバルビツール酸化合物を得る。

【0094】5-(4-ブタニル)-5-(1-メチルブチル)-バルビツール酸:上記バルビツールのメタノール溶液に-78℃でオゾンを通す。溶液がブルーとなった後、窒素を吹込んで過剰のオゾン除去する。次いでジメチルスルフィドを加え、溶液を室温で一晩攪拌する。溶媒を減圧除去して、0.62gの所望アルデヒドを得る。

【0095】上記アルデヒドとBSAの複合:25mlの水、5mlのジメチルホルムアミドおよび5mlのエタノールの溶液に、188mgのBSAを加える。溶液のpHを6.2に調整し、上記アルデヒド(18.6mg、0.07ミリモル)を加える。1時間攪拌後、シアノホウ水素化ナトリウム(472mg、7.5ミリモル)を加え、反応液を一夜攪拌する。次いで物質を、pH9の水に対して透析し、そしてpH7の水に対して透析する。物質を凍結乾燥して、113mgのバルビツール酸-BSA複合物を得る。

【0096】実施例4

5-(1-メチルブチル)-5-ホルミルメチルバルビツール酸:ナトリウム・セコバルビタール(5.30g、22.2ミリモル)のメタノール溶液に、溶液がブルー色に変わるまで、オゾン流を通す。反応液に窒素を通して過剰のオゾン除去した後、ジメチルスルフィド(14ml)を加える。反応液を室温で一晩攪拌した後、溶媒を回転エバポレータにて除去する。次いでアルデヒドをシリカプレッププレート(preppate)にて、酢酸エチル/ヘキサン(1:1)を用いて精製する。

【0097】実施例5

ジメチル-2-(3-メチルシクロヘキシル)-マロネート:ナトリウム金属(7.02g、0.30g原子)を無水メタノール(250ml)と反応させる。次いでこれにジメチルマロネート(70ml)を滴下し、その間反応温度を50℃に維持する。次いでこの溶液に、3-メチルシクロヘキシルプロミド(54.0g、0.30モル)を滴下し、反応液を一夜還流する。メタノールを回転エバポレータにて除去し、残った物質をエーテルと水間に分配する。エーテル層を分離し、 $MgSO_4$ で乾燥し、蒸発して黄色油状物を得る。この物質を95~106℃および1.2mmHg圧の蒸留に付し、透明油状物を得る。

【0098】ジメチル-2-(5-ヘキセニル)-2-(3

ーメチルシクロヘキシル)ーマロネート:無水N,N-ジメチルホルムアミド(50ml)中の水素化ナトリウム(2.53g, 0.06モル)のスラリーに、ジメチル2-(3-メチルシクロヘキシル)ーマロネート(14.46g, 0.06モル)を滴下する。滴下終了後、もはや水素が発生しなくなるまで、反応液を攪拌する。次いで反応液に、1-プロモ-6-ヘキセン(10.33g, 0.06モル)を滴下した後、攪拌する。反応の進行に伴って、シリカプレートにて酢酸エチル/ヘキサン(40:60)を用いる分析クロマトグラフィーに付す。反応の終了後、水(20ml)を加え、溶媒のほとんどを高減圧下で除去する。残った物質を水とエーテル間に分配し、エーテル層を2回水洗する。エーテル溶媒をMgSO₄で乾燥し、蒸発して粘濁黄色油状物を得る。次いで生成物を127~134℃および0.44mmHg圧にて蒸留し、透明油状物を得る。

【0099】5-(3-メチルシクロヘキシル)-5-(5-ヘキセニル)バルビツール酸:ナトリウム金属(1.24g, 0.05g原子)を無水エタノール(75ml)と反応させる。反応の終了後、尿素(5.16g, 0.08モル)を加え、次いで上記マロネート(6.67g, 0.02モル)を加える。60時間還流後、エタノールを蒸発し、物質を水(pH4)と酢酸エチル間に分配する。酢酸エチル層をMgSO₄で乾燥し、蒸発して白色ゴム状物質を得る。次いでこの物質をシリカプレッププレートにて、酢酸エチル/ヘキサン(40/60)で精製して、純粋なバルビツール酸化合物を得る。

【0100】5-(3-メチルシクロヘキシル)-5-ホルミルブチルバルビツール酸:メタノール(20ml)に溶解した上記バルビツール酸化合物(40mg, 0.13ミリモル)の溶液に、溶液がブルーになるまでオゾンを通す。溶液に窒素を通して過剰オゾン除去し、ジメチルスルフィド(2ml)を加える。一夜攪拌後、溶媒を除去して、所望アルデヒドを白色ゴム状物質で得る。

【0101】実施例6

sec-ブチルジメチルマロネート:ナトリウム金属(6.9g)を120mlの無水メタノールと反応させる。この溶液に39.6g(0.3モル)のジメチルマロネートを加える。反応混合物を還流し、2-プロモブタン(41.1g, 0.3モル)を加える。16時間還流後、反応混合物を冷却し、メタノールを減圧除去する。生成物をエチルエーテルで抽出し、次いで水および半飽和塩水で洗う。有機物を硫酸マグネシウム上で乾燥する。減圧蒸発でエチルエーテルを除去後、粗油状物を分留して、24gの所望生成物を得る(b. p. 95-105℃/15mmHg)。

【0102】5-sec-ブチルバルビツール酸:110mlの無水エタノールを7.72gのナトリウム金属と反応させる。次いで17.6g(0.1モル)のジメチルsec-ブチルマロネートを加えた後(約5分後)、尿素(6.7

2g)を加える。反応混合物を15時間還流し、60mlのエタノールを留去する。残渣に200mlの水を加えた後、20mlの濃硫酸を加える。沈殿した結晶を濾別する。次いで生成物を水より再結晶して、8gの無色結晶を得る。

【0103】5-sec-ブチル-5-(カルボキシ-1-プロピレン)バルビツール酸:ニッポン100mlフラスコに、265mg(6.625ミリモル)の水素化ナトリウム(60%油状分散体)を入れる。水素化ナトリウムをヘキサンで洗い、次いで5mlのTHF中の1219mgの5-sec-ブチルバルビツール酸を加えた後、50mlのジメチルホルムアミドを加える。反応混合物を室温で1.5時間攪拌し、912μlのエチルプロモクロトネートを加えた後、900mgの無水ヨウ化ナトリウムを加える。反応混合物を48時間還流し、次いで回転蒸発で乾燥する。残渣を酢酸エチルで抽出し、水、5%重亜硫酸ナトリウム、塩水で洗い、硫酸マグネシウム上で乾燥する。溶媒を除去し、粗物質をシリカゲルにて、溶媒剤として酢酸エチルを用いるカラムクロマトグラフィーで精製する。所望生成物の収率78%。

【0104】5-sec-ブチル-5-(カルボキシ-1-プロピレン)バルビツール酸:152mgの5-sec-ブチル-5-カルボキシ-1-プロピレンバルビツール酸を15mlの濃塩酸中で、45分間還流する。反応混合物を蒸発乾固して、所望生成物を無色結晶で得る(収率95%, m. p. 168~171℃)。

【0105】実施例7

250mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシメチルバルビツール酸を25mlの濃塩酸中で、45分間還流する。反応混合物を冷却し、沈殿した結晶を濾別する。水より再結晶して、190mgの無色結晶を得る(m. p. 238~240℃)。

【0106】実施例8

200mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸を25mlの濃塩酸と共に、1時間還流する。反応混合物を減圧蒸発し、固体残渣を水より品出させる。無色結晶(m. p. 189~192℃)の収量120mg。

【0107】実施例9

5-sec-ブチル-5-カルボキシ-1-プロピレンバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:26.8mg(0.1ミリモル)の5-sec-ブチル-5-カルボキシ-1-プロピレンバルビツール酸を0.3mlの無水DMFに溶解し、この溶液に、0.3mlのDMFに溶解した20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを加えた後、0.3mlのDMF中の11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミドを加える。反応混合物を室温で攪拌する。30分後、42mgのアミノメチルフルオレセインを加える。20時間後、反応混合物を回転蒸発で乾燥し、シリカゲルにて溶媒剤として酢酸エチル/

酢酸(100:0.2)を用いるカラムクロマトグラフィーで精製する。

【0108】実施例10

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシ-1-プロピレンバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として28.2mg(0.1ミリモル)の5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシルクロニルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いる分取薄層クロマトグラフィーで精製する。

【0109】実施例11

5-イソプロピル-5-(カルボキシ-1-プロピレン)バルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として21.4mgの5-エチル-5-カルボキシメチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いる分取薄層クロマトグラフィーで精製する。

【0110】実施例12

5-エチル-5-カルボキシメチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として21.4mgの5-エチル-5-カルボキシメチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるクロマトグラフィーで精製する。

【0111】実施例13

5-sec-ブチル-5-カルボキシメチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として24mgの5-sec-ブチル-5-カルボキシメチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いる分取薄層クロマトグラフィー(PTLC)で精製する。

【0112】実施例14

sec-ブチル-5-カルボキシエチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として26mgの5-sec-ブチル-5-

カルボキシエチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0113】実施例15

5-sec-ブチル-5-カルボキシプロピルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として28mgの5-sec-ブチル-5-カルボキシプロピルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物を溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0114】実施例16

5-sec-ブチル-5-カルボキシブチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として29mgの5-sec-ブチル-5-カルボキシブチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物を溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0115】実施例17

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシメチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として24mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシメチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0116】実施例18

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシエチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として25mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシエチルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて、溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0117】実施例19

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシプロピルバル

ビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として26.5mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0118】実施例20

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインのカップリング反応:本例では、出発物質として28mgの5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸、11.5mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび42mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。生成物をシリカゲルにて溶離剤として酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるPTLCで精製する。

【0119】実施例21

5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシメチルバルビツール酸とフルオレセインアミド(異性体)の複合:5-(1-メチルブチル)-5-カルボキシメチルバルビツール酸(58.3mg)に、塩化チオニル(2ml)を加え、溶液を1.5時間還流する。過剰の塩化チオニルを減圧除去し、抽出物を冷却する。これに、乾燥ピリジン(1ml)中のフルオレセインアミド(異性体1)の溶液を加える。物質をシリカプレッププレートにて、酢酸エチル/酢酸(100:0.2)を用いるクロマトグラフィーに付し、所望トレーサーを得る。

【0120】実施例22

5-(3-メチルシクロヘキシル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸の複合:本例では、出発物質として21mgの5-(3-メチルシクロヘキシル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸、6.9mgのN-ヒドロキシスクシンイミド、19.9mgのジシクロヘキシルカルボジイミドおよび24mgのアミノメチルフルオレセインを用い、実施例9の操作に従って製造を行う。

【0121】実施例23

5-(1-メチルブチル)-5-ホルミルメチルバルビツール酸とアミノメチルフルオレセインの複合:2mlの水およびpH6の2mlのメタノールの溶液に、5-(1-メチルブチル)-5-ホルミルメチルバルビツール酸(141mg, 0.58ミリモル)およびアミノメチルフルオレセイン(210mg, 0.58ミリモル)を加える。N,N-ジメチルホルムアミドを滴下して溶解を完了する。1時間攪拌後、直ちにシアノホウ水素化ナトリウム(38.8mg)を加える。一夜攪拌後、溶液を蒸発し、物質を逆相分取プレート(シリカゲル)にて、溶離剤としてメタノール/水/トリフルオロ酢酸を用い精製する。

ール/水/トリフルオロ酢酸を用い精製する。

【0122】実施例24

ジエチルシクロペンチルマロネート(最も好ましいトレーサー、前記式[30]の製造):80mlの無水エタノール中の4.6g(0.2モル)のナトリウム金属の溶液に、30.4ml(0.2モル)のジエチルマロネートを加える。得られる混合物を少し攪拌して、粘濁白色沈殿物を生成する。この懸濁液に、21.4ml(0.2モル)のシクロペンチルプロミドを加える。混合物を12時間加熱し、次いで周囲温度に冷却する。回転蒸発でエタノールのほとんどを除去し、得られる残渣を250mlの水で希釈し、ジエチルエーテル(100ml×3)で抽出する。コンバインした抽出物をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、濃縮する。6インチのビグレウクス(Vigreux)カラムにて、6mmHgで蒸留を行い、32.232gの無色液体(b.p. 122~125°C)を得る。

【0123】5-シクロペンチルバルビツール酸:50mlの無水エタノール中の3.48g(15.1ミリモル)のナトリウム溶液に、3.02g(50ミリモル)の尿素および上記製造したジエチルシクロペンチルマロネート10g(44ミリモル)を加える。形成する粘濁白色スラリーを、12時間還流する。回転蒸発でエタノールのほとんどを除去し、残渣を100mlの水で希釈し、100mlの98% H₂SO₄で酸性化する。形成する白色固体を濾取し、真空ポンプで乾燥する。固体を水より再結晶し、さらに5%水/エタノールより2回目の再結晶を行って、7.006gの無色板状結晶(m.p. 222~223°C)を得る。

【0124】5-シクロペンチル-5-[(エトキシカルボニル)-2-プロペニル]バルビツール酸:1.0mlのテトラヒドロフランおよび1.0mlのジメチルホルムアミドの混合物中の、上記製造した200mg(1.02ミリモル)のバルビツール酸化合物の溶液を、1.0mlのジメチルホルムアミド中の32mg(80% 脂肪酸分体、1.07ミリモル)の水素化ナトリウム(予め5mlのベンタンで3回洗って置く)の懸濁液に加える。周囲温度で1時間攪拌後、168μl(1.22ミリモル)のエチル4-ブロモクロトネートを加え、反応液を70°Cに加熱し、12時間攪拌する。溶液を冷却し、回転エバポレータにて濃縮し、酢酸エチルで希釈し、水(1ml×2)で洗う。溶液をMgSO₄上で乾燥し、濃縮する。ヘキサンを詰めた1×18cmカラムにて、それぞれ50mlの10%, 20%, 30%, 50%および70%酢酸エチル/ヘキサンで溶離するクロマトグラフィーを行って、297mgの透明淡黄色油状物を得る。

【0125】5-シクロペンチル-5-[3-カルボキシ-2-プロペニル]バルビツール酸:1.0mlのジメチルホルムアミド中の前記実験で製造した292mg(0.94ミリモル)のエステルの溶液に、5.0mlの15% H₂SO₄水溶液を加える。混合物を45分間還流し、冷却す

る。溶液を濃縮して粘濁油状物とし、酢酸エチルで希釈し、水(1ml×2)で洗う。MgSO₄上で乾燥し、溶媒除去を行って246mgのオフホワイト固体を得る。固体を6mlの水中で煮沸し、冷却して132mgの白色固体(m.p. 226~227℃)を得、晶出させ、次いで濾過で分離する。

【0126】5-[3-[(2a-フルオレセイン)メチルアミノカルボニルオキシ]-2-プロペニル]-5-シクロペンチル-バルビツール酸:300μlのジメトキシエタン中の前記実験で製造した7.8mg(27μmol)の酸化合物の冷却(0℃)溶液に、3.6μl(27μmol)のイソブチルクロロホルメートを加える。溶液を周囲温度に加温し、1.3時間攪拌する。該溶液を0℃に再冷却し、これに200μlのジメチルホルムアミド中の10.9mg(27μmol)のアミノメチルフルオレセイン塩酸塩および7.6μl(64μmol)のトリエチルアミンの第2溶液を加え、次いで溶液を周囲温度に加温し、12時間攪拌する。溶媒をポンプ減圧で除去し、残渣を溶媒として80%メタノール/クロロホルムを用いる分取層クロマトグラフィーで精製する。主要な蛍光バンドを10%メタノール/クロロホルムで溶解し、濃縮してから10.2mgのオレンジ色固体を得る。

【0127】実施例25

ジエチルシクロペンチルマロネート(最も好ましい免疫抗原、前記式[29]の製造):-78℃に冷却維持した174g(2.63mol)の新しい解重合したシクロペンタジエンに、87.5g(2.50mol)のHClガスを加える。その間に、400mlの無水エタノール中の21.4g(0.93mol)のナトリウムの溶液に、152ml(1.0mol)のジエチルマロネートを加える。HClの添加終了後、該マロネート溶液に-78℃に維持した粗黄色クロリドを1mlずつ加える。かなりの熱が発生し、黄色が消え、そして各部を加える毎に、多量の白色沈殿が形成する。次いで懸濁液を17時間攪拌し、回転蒸発でエタノールのほとんどを除去し、200mlの水を加えて反応を抑え、ジエチルエーテル(100ml×5)で抽出する。コンバインした抽出物をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、濃縮して透明黄色油状物とする。この物質の一部を0.5mmHgで蒸留して、19.091gの透明グリーン油状物(b.p. 91~94℃)を得る。

【0128】5-(2-シクロペンテニル)バルビツール酸:このバルビツール酸化合物は、上記5-シクロペンチルバルビツール酸の場合に記載した操作に従って合成した。

【0129】5-(2-シクロペンテニル)-5-[3-(エトキシカルボニル)プロピル]バルビツール酸:4mlのテトラヒドロフランおよび17mlのジメチルホルムアミドの混合物中の、434mg(3.79ミリモル)の水素化カリウム(予めヘキササン5mlで3回洗っておく)の懸濁液に、上記製造した700mg(3.60ミリモル)の5-

(2-シクロペンテニル)バルビツール酸を加える。混合物を1時間攪拌した後、0.51ml(3.96ミリモル)のエチル2-ブロモプロピオネートおよび178mg(1.18ミリモル)の無水ヨウ化ナトリウムを加える。溶液を12時間還流し、周囲温度に冷却せしめ、72時間攪拌する。回転蒸発で溶媒のほとんどを除去し、水を加えて反応を抑え、10mlの酢酸エチルで4回抽出する。コンバインした抽出物をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、濃縮する。シリカゲルにて、5%メタノール/クロロホルムで溶解するクロマトグラフィーに付して、917mgの淡黄色油状物を得る。

【0130】5-(2-シクロペンテニル)-5-(3-カルボキシプロピル)バルビツール酸:2mlのテトラヒドロフラン中の前記実験で製造した737mg(2.61ミリモル)のエステルの溶液に、6mlの5%硫酸/水の溶液を加える。混合物を周囲温度で数日間攪拌する。反応液を回転エバポレータで濃縮し、残渣をシリカゲルにて、2%, 5%および10%メタノール/クロロホルムで溶解するクロマトグラフィーに付し、215mgの白色結晶物質を得る。

【0131】5-(2-シクロペンテニル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸とサイログロブリンのカップリング反応:12.65mg(4.7×10⁻⁴mol)の5-(2-シクロペンテニル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸を、1.0mlのp-ジオキサンに溶解して、5-(2-シクロペンテニル)-5-カルボキシプロピルバルビツール酸を、混合無水物のサイログロブリンにカップリング反応させる。この混合物に、8×10⁻⁴molのトリエチルアミンおよび8×10⁻⁴molのイソブチルクロロホルメートを加える。反応液を室温で2時間攪拌し、その間、微細な白色沈殿物が形成する。この懸濁液を、11.0mlの0.006Mホウ酸ナトリウム(pH 9.5)に溶解した牛サイログロブリン(200mg)の懸濁液に加入する。室温で2時間攪拌後、混合物を4交替(それぞれ2l)の0.05Mリン酸ナトリウム(pH 7.5)に対して透析する。なお、透析は2~8℃で実施し、各透析緩衝剤を交替する間隔を少なくとも8時間とした。透析後、最終プロテイン濃度をロウリイ法(Loewy Method)[J. Biol. Chem., Vol. 193, 265-275頁(1951年)参照]で測定し、かつ置換度をTNBS(トリニトロベンゼンスルホネート)滴定で測定した。

【0132】実施例26

ジエチル[3-メチル-2-ブテニル]マロネート(最も好ましいトレーサー、前記式[31]の製造):10mlのテトラヒドロフランおよび5mlのジメチルホルムアミドの混合物中の、422mgの水素化ナトリウム(80%鉱油分散体、14.1ミリモル、予めペンタン3mgで3回洗っておく)の冷却(0℃)懸濁液に、2.04ml(13.4ミリモル)のジエチルマロネートを加える。混合物を周囲温

度に加温し、0.6時間攪拌する。次いでブレンビプロミド(2.00g、13.4ミリモル)を注入し、溶液を周囲温度で30分間、次いで置換温度で1時間攪拌する。次に溶液を周囲温度まで冷却せしめ、12時間攪拌する。水を加えて反応を抑え、10%水性硫酸でpH3に酸性化し、エーテル(10ml×2)で抽出する。コンバインした洗液を無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮する。シリカゲルにて、4%、7%および10%エーテル/ヘキサンで溶離するクロマトグラフィーを行い、濃縮して2.734gの透明無色油状物を得る。

【0133】5-[3-メチル-2-ブテニル]バルビツール酸:1.0mlの無水エタノール中の70mg(3.03ミリモル)のナトリウムの溶液に、61mgの尿素(1.01ミリモル)を加えた後、前記実験で製造した200mgのジエチルフェニルマロネート(0.88ミリモル)を加える。溶液を12時間静かに還流する。回転蒸発でエタノールのほとんどを除去し、残渣を水に希釈する。溶液をpH3に酸性化し、酢酸エテル(10ml×2)で抽出する。コンバインした有機相を無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮して214mgのオフホワイト固体とする。

【0134】5-[3-メチル-2-ブテニル]-5-アリルバルビツール酸:前記反応で製造した固体を、0.5mlのテトラヒドロフランおよび1.0mlのジメチルホルムアミドの混合物に溶解し、33mgの水素化ナトリウム(80%鉱油分散体、1.09ミリモル)を加え、混合物を1時間攪拌する。次いでアリルプロミド(0.11ml、1.13ミリモル)を加え、溶液を周囲温度で72時間攪拌する。希塩酸をpH3まで加えて反応を抑え、酢酸エテル(10ml×3)で抽出する。コンバインした抽出物を無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮する。シリカゲルにて、20%、30%および40%酢酸エテル/ヘキサンで溶離するクロマトグラフィーを行い、100mgの無色油状物を得る。

【0135】5-[4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニル]-5-アリルバルビツール酸:1.0mlのジクロロメタン中の前記実験で製造したバルビツール酸誘導体(100mg、0.42ミリモル)の溶液に、6mg(42μモル)のサリチル酸および9mg(84μモル)の二酸化セレンを加える。懸濁液を水浴に置き、1-ブチルヒドロパーオキシドの3.8Mベンゼン無水溶液0.29ml(1.09ミリモル)を加える。次いで懸濁液を周囲温度で12時間攪拌し、反応混合物を濃縮し、シリカゲルカラムにて直接、40%、50%、60%および70%酢酸エテル/ヘキサンで溶離するクロマトグラフィーに付す。幾つかの出発物質および他の生成物に加えて、2.1mgの無色油状物を単離する。

【0136】5-[4-[(2a-フルオレセニル)メチルアミノカルボニルオキシ]-3-メチル-2-ブテニル]-5-アリルバルビツール酸:200μlのテトラヒドロフラン中の前記実験で製造した5mg(20μモル)の

油状物の冷却(0℃)溶液に、200μlのホスゲンの12%ベンゼン溶液を加える。溶液を周囲温度に加温し、0.6時間攪拌する。回転蒸発で溶媒を除去し、残渣を100μlのジメチルホルムアミドに再溶解し、200μlのジメチルホルムアミドおよび5.6μl(40μモル)のトリエチルアミンの混合物中の、8mg(20μモル)のアミノメチルフルオレセイン塩酸塩の溶液を加える。溶液を周囲温度で12時間攪拌する。溶媒を減圧ポンプで除去し、残渣を10%メタノール/クロロホルムで溶離する薄層クロマトグラフィーで精製する。主要バンドを80%メタノール/クロロホルムで溶離し、濃縮して6.6mgのオレンジ色固体を得る。

【0137】前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対し産生するバルビツレート用抗体および前記式[5]のバルビツレートトレーサーは、バルビツレートの蛍光偏光免疫学的検定法において、驚くべき良好な結果をもたらすことがわかった。しかしながら、トレーサーを抗体の最も好ましい組合せは、前記式[30]の構造を持つトレーサーと、前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対し産生する単クローン性または多クローン性抗体との組合せである。

【0138】本発明方法の別の利点は、ゼロと区別できる分析物の最低測定可能濃度を95%の信頼で規定する。当該検定法の感度がセコバルビツールに対する測定で約60ng/mlであることである。

【0139】さらに本発明方法の重要な利点は、一般使用の多数のバルビツレートに対するクロス反応性である。本発明方法によって、一般使用のバルビツレートのクロス反応性が試験される。それぞれの場合において、正常なヒトの無薬物尿に既知量(200ng/ml)のバルビツレート試験化合物を加えた後、アボット・ラボラトリーズのTDxクリニカル・アナライザーまたはADxドラッグス・オブ・アブユース・システムで、化合物を検定する。

【0140】トレーサーが前記式[5]の構造を有し、抗体が前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する、本発明検定法による、一般使用のバルビツレートの代表的なクロス反応性データを下記表3(a)に示す。なお、表中の5つの欄は、以下の情報を示す。

- (1)欄1は、検定する個々のバルビツレートを示す。
 - (2)欄2は、無薬物尿に加えるバルビツレート試験化合物の量を示す。
 - (3)欄3は、得られるヒト尿中に検出されるバルビツレート試験化合物の量を示す。
 - (4)欄4は、検定する個々のバルビツレートを過大評価(1.0より大、たとえば1.33)または過小評価(1.0より小、たとえば0.83)するファクターを示す。
 - (5)欄5は、クロス反応率を示す。
- 【0141】

表3(a)

1	2	3	4	5
セコバルピタール	200 ng/mL	200 ng/mL	1.00	100%
アモバルピタール	200 ng/mL	310 ng/mL	1.55	155%
ブタルピタール	200 ng/mL	201 ng/mL	1.00	100%
ペントバルピタール	200 ng/mL	210 ng/mL	1.05	105%
フェノバルピタール	200 ng/mL	210 ng/mL	1.05	105%
タルブタール	200 ng/mL	180 ng/mL	0.90	90%

【0142】表に挙げたバルピツレートのそれぞれを、

標準として使用され、かつクロス反応率100%(評価
ファクター1.0)を有すると判定されたセコバルピタ
ールと比較する。ファクター1.0とは、当該検定法が
正常なヒトの無薬物尿に最初に添加した試験化合物の真
際濃度を過大評価または過小評価のいずれもしないこと
を示す。換言すれば、正常なヒトの無薬物尿に200ng
のセコバルピタールを加えたときに、得られる尿試料中
に約200ngのセコバルピタールが検出されることを示
す。すなわち、ファクターが1.0に近づくにつれて、
分析される個々の試験化合物に対する検定法がより正確
となる。このファクターおよびクロス反応性は共に、ア
ボット・ラボラトリーズのTDXクリニカル・アナライ
ザーまたはADxドラッグス・オブ・アブュース・シス
テムの数値を読むことによって測定することができ、ま
たこれらの測定器は、検定中に実際に検出されるバルピ
ツレートの量を下記の数式から測定するのに使用しうる
ものである。

*【0143】

$$\text{ファクター} = \frac{\text{測定濃度}}{\text{存在濃度}}$$

実例として:

$$(1) 1.0 = \frac{200 \text{ ng/mL}}{200 \text{ ng/mL}} \quad (\text{正確})$$

$$(2) 0.83 = \frac{167 \text{ ng/mL}}{200 \text{ ng/mL}} \quad (\text{過小評価})$$

$$(3) 1.33 = \frac{267 \text{ ng/mL}}{200 \text{ ng/mL}} \quad (\text{過大評価})$$

【0144】欄5に示されるクロス反応率は、下記の数
式から算出される。

$$\text{クロス反応率(\%)} = \frac{\text{得られるヒト尿中に検出される試験化合物の濃度}}{\text{正常なヒトの無薬物尿に添加される試験化合物の濃度}} \times 100$$

【0145】しかしながら、本発明の検定法の最も好ま
しい具体例において、トレーサーが前記式【30】の構造
を有し、抗体が前記式【29】の構造を持つ免疫抗原に対※

※して産生する、一般使用のバルピツレートの代表的クロ
ス反応性データを下記表3(b)に示す。

【0146】

表3(b)

1	2	3	4	5
セコバルピタール	200 ng/mL	200 ng/mL	1.00	100%
アモバルピタール	200 ng/mL	85 ng/mL	0.43	43%
アプロバルピタール	200 ng/mL	123 ng/mL	0.62	62%
ブタルピタール	200 ng/mL	227 ng/mL	1.13	113%
ブタバルピタール	200 ng/mL	489 ng/mL	2.24	224%
プラロバルピタール	200 ng/mL	188 ng/mL	0.94	94%
ペントバルピタール	200 ng/mL	129 ng/mL	0.65	65%
フェノバルピタール	200 ng/mL	140 ng/mL	0.70	70%
タルブタール	200 ng/mL	531 ng/mL	2.65	265%

【0147】本発明の他の利点は、非バルピツレート化
合物との低クロス反応性である。クロス反応性はまた、
一般使用のバルピツレートに類する化学構造を有する化
合物を用いて試験する。一般使用のバルピツレートに類
する化学構造を有する化合物に対する低クロス反応性を
示す代表的クロス反応性データを、下記表4(a)(前記式

【5】の構造を持つトレーサーの場合)および表4(b)(前
記式【30】の構造を持つトレーサーの場合)に示す。な
お、表4(a)および4(b)中の5つの欄は、前記表3(a)
の場合に記載したのと同じ情報を示す。

【0148】

50

表4(a)

1	2	3	4	5
グルテチミド	10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	180 ng/mL ND	0.018	1.80%
p-ヒドロキシ フェニトイン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	1200 ng/mL 340 ng/mL ND	0.012 0.034	1.20% 3.40%
フェニトイン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	1020 ng/mL 320 ng/mL ND	0.0102 0.032	1.02% 3.20%
プリミドン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	320 ng/mL 90 ng/mL ND	0.0032 0.009	0.32% 0.90%
イブプロフェン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	70 ng/mL ND ND	0.0007	0.07%
OR-イブプロフェン	1000 $\mu\text{g/mL}$ 100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	60 ng/mL ND ND ND	0.00006	0.006%
フェノプロフェン	430 $\mu\text{g/mL}$ 215 $\mu\text{g/mL}$	290 ng/mL 180 ng/mL	0.00067 0.00084	0.067% 0.084%
ナプロキセン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$	70 ng/mL ND	0.0007	0.07%

ND=非検出: 該検定法の感度(60 ng/mL)より小さい濃度

[0149]

表4(b)

1	2	3	4	5
グルテチミド	10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	480 ng/mL 89 ng/mL	0.048 0.089	4.80% 8.90%
p-ヒドロキシ フェニトイン	500 $\mu\text{g/mL}$ 100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$	218 ng/mL 101 ng/mL ND	0.00004 0.00010	0.04% 0.10%
プリミドン	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$	195 ng/mL ND	0.00019	0.19%
グルテチミド	100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$	412 ng/mL 117 ng/mL ND	0.00041 0.00117	0.41% 1.17%

【0150】数種の一般使用のバルビツレート、並びに他のバルビツレートおよびバルビツレート類似構造に類する化学構造を有する化合物に対する低クロス反応性を示す代表的クロス反応性データを、下記表5に示す。こ

の場合、免疫抗原は前記式[29]の構造を持ち、トレーサーは前記式[30]および[31]の構造を持つ。

[0151]

表5

化合物	前記式[31]			前記式[30]	
	添加濃度 (ng/mL)	検出濃度 (ng/mL)	クロス反応率 (%)	検出濃度 (ng/mL)	クロス反応率 (%)
アルフェナール	1200	81	167	1130	94
アモバルビタール	1200	870	73	490	41

(29)

特開平4-231873

55				56
アプロバルピタール	1200	1670	139	820
ブラロバルピタール	1200	1910	159	1400
ブタバルピタール	1200	HI	>167	HI
ブタルピタール	1200	HI	>167	2000
ブトバルピタール	1200	NA	NA	580
シクロベント				
バルピタール	1200	HI	>167	HI
ベントバルピタール	1200	770	64	740
フェノバルピタール	1200	1280	107	740
タルブタール	1200	HI	>167	HI

NA=入手不可

【0152】

表5(つづき)

クロス反応性の望ましくない化合物

化合物	前記式[31]			前記式[30]	
	添加濃度 (ng/mL)	検出濃度 (ng/mL)	クロス反応率 (%)	検出濃度 (ng/mL)	クロス反応率 (%)
フェニトイン	100	90	0.09	40	0.04
EPH(フェニトイン 代謝産物)	500	290	0.058	200	0.001
イブプロフェン	1000	50	0.005	20	0.002
ナプロキセン	100	20	0.02	20	0.02
フェノプロフェン	200	40	0.02	30	0.015
グルテチミド	10	470	4.70	470	4.70
プリミドン	100	240	0.24	180	0.18

【0153】さらに、下記表6(a)に記載の化合物は、0.6 µg/mL以下のクロス反応性結果を示す。

1. 0、10、0および100、0 µg/mLで試験した 30 【0154】

とき、前記式[5]の構造を持つトレーサーに対し、0、

表6(a)

アセタミノフェン	アセチルサリチル酸	アルブラゾラム
アミノピリン	アミトリプチリン	アモキシリン
d,l-アンフェタミン	アンピシリン	アンタプュース
アボモルフィン	アテノロール	フトロフィン
ベンゾカイン	ベンゾイルエクゴニン	カフェイン
次亜塩素酸カルシウム	カルバマゼピン	セファレキシシ
クロルジアゼポキシド	クロロキノ	クロルフェニラミン
クロルプロマジン		クロルプロバミド
シメチジン	クロニジン	コカイン
コデイン	シクリジン	デキストロメトルファン
ジアゼパム	ジフルニザール	ジゴキシシ
エクゴニン	エフェドリン	エビネフリ
エリスロマイシン	エストリオール	エストロン-3-スルフェ ート
フルラゼパム	フロセミド	ゲンチシン酸
グアヤコールグリセリル	ヒドロクロロチアジド	4-OH-PIP-フェン
エーテル		シクリジン
イミプラミン	インドメタシン	レボチロキシシ

57

58

ロキサピン	メペリジン	メフェニトイン
メプロバメート	メタドン	d,l-メタムフェタミン
メタクワロン	メチルドーパ	メチプリロン
メトプロロール	モルフィン	ナフィシリン
ナロキシソ	ナロルフィン	ナルトレキソ
ニコチン	ニコチン酸	ニフェジピン
ノルエチンドロン	オキサゼパム	ベニシリン
フェンシクリジン	フェンメトラジン	フェノチアジン
フェンテルミン	フェニルブタゾン	フェニルプロパノラミン
ピロキシカム	塩化カリウム	プロメタジン
プロマジン	プロボキシフェン	プロプラノロール
キニーネ	二硫酸キニーネ	キニジン
テルブタリン	テトラシクリン	デルター-8-テトラヒドロ カンナビノールカルボン酸
デルター-9-テトラヒ ドロカンナビノールカ ルボン酸	テトラヒドロソリン	テオフィリン
チオプロバゼート	トリウムテレノ	トリフルオベラジン
トリメトプリム	尿酸	ソメビラック

【0155】 下記表6(b)に記載の化合物は、100. 20 を示す。

0 μg/mlで試験したとき、前記式[30]の構造を持つ 【0156】

トレーサーに対し、80 ng/ml以下のクロス反応性結果

表6(b)

アセタミノフェン	アセトプロマジン
N-アセチル-L-シスチン	アセチルサリチル酸
アルファプロジン	アルプラゾラム
アルプレノロール	アマンタジン
アミノピリン	アミトリプチリン
シス-10-OH-アミトリプチリン	トランス-10-OH-アミトリプチリン
アモキシシリン	d,l-アンフェタミン
p-OH-アンフェタミン	アンピシリン
アニレリジン	アンタビュース
アボモルフィン	アプロバルピタール
アスパルターメ	アテノロール
アトロピン	アザタジン
ベクロメタゾン	ベナクチジン
ベンゾカイン	安息香酸
ベンゾイルエグイニン	ベンズトロピン
ベンジルベニシリン	プロモクリプチンメシレート
ブロムフェニラミン	ブビバカイン
ブスピロン	ブトルファノール
カフェイン	次亜塩素酸カルシウム
カルバマゼピン	カルバマゼピン-10,11-エポキシド
カリソプロドール	カルフェナジン
セファレキシ	セファロジン
クロラール水和物	クロラムフェニコール
クロルシアゼボキシド	エフェドリン
クロロキン	クロロチアジド
クロルフェニラミン	クロルプロマジン
クロルプロバミド	クロルゾキサゾン

コレステロール
 シプロフロキサシン
 クリンダマイシン
 クロニジン
 コデイン
 β -コルトール
 シクリジン
 シクロゾシン
 デオキシコルチコステロン
 デキストロメトロファン
 ジアゼパム
 ジブカイン
 ジフルニザール
 ジゴキシシ
 ジヒドロモルフィン
 ジルチアゼム
 ジフェノキシレート
 ジピリダモール
 ドチェビン
 ドキシラミン
 エフェドリン
 エリスロマイシン
 エストリオール
 エタンプトール
 4-エチル-2,5-ジメトキシ
 アンフェタミン(DOET)
 フェンカムファミン
 フェノプロフェン(*)
 フルフェナム酸
 フルフェナジン
 フルービプロテン
 ゲンチシン酸
 グアヤコールグリセリルエーテル
 馬尿酸
 ヒドララジン
 ヒドロコドン
 ヒドロモルホン
 5-ヒドロキシインドール-2-
 カルボン酸
 イブプロフェン(**)
 OH-イブプロフェン(**)
 イミノブラミン
 インドール-3-酸
 イブロンアジド
 イソクサプリン
 ケトプロフェン
 レバロルファン
 レボチロキシシ
 ロベラミド
 ロラゼパム

シメチジン
 クレマスチン
 クロミブラミン
 コカイン
 コルチゾン
 シクラゾシン
 シクロベンザプリン
 シプロヘプタジン
 デシブラミン
 ジアセチルモルフィン
 ジベンゼピン
 ジエチルプロピオン
 ジギトキシシ
 ジヒドロコデイン
 10,11-ジヒドロキシカルバマゼピン
 ジフェンヒドラミン
 ジフェニルヒダントイン
 ドバミン
 ドキセピン
 エクゴニン
 エピネフリン
 エストラジオール
 エストロン-3-スルフェート
 エチナメート
 エチルモルフィン
 フェンフルラミン
 フェンタニル
 フルオキセチン
 フルラゼパム
 フロセミド
 グリコピロレート
 ハロペリドール
 ヒスタミン
 ヒドロクロロチアジド
 ヒドロコルチゾン
 6-ヒドロキシインドール-3-酢酸
 ヒドロキシジン
 COOH-イブプロフェン(**)
 イミノスチルベン
 インドール-3-酢酸
 インドメタシン
 イソプロテレノール
 ケタミン
 ラベタロール
 レボルファノール
 リドカイン
 ロラタジン
 ロクサピン

LSD
 メフェナム酸
 メペリジン
 メピバカイン
 メスカリン
 メタドン—次代謝産物
 4,1-メタンフェタミン
 メタクワロン
 メトリメブラジン
 メトキシプロマジン
 4-メチル-2,5-ジメトキシ
 アンフェタミン(DOM)
 3,4-メチレンジオキシ-N-
 エチルアンフェタミン(MDE)
 メチルフェニデート
 メトクロプラミド
 メトロニダゾール
 モノエチルグリシンキシリジド
 (MEGX)
 モルフィン-3β-D-グルクロニド
 ナルブフィン
 ナロキソン
 ナファゾリン
 ニコチンアミド
 ニコチン酸
 p-ニトロフェノール
 ノルクロリアゼボキシド
 ノルドキセピン
 N-ノルモルフィン
 N-ノルプロボキシフェン
 ノルトリブチリン
 トランス-10-OH-ノルトリブチ
 リン
 オクトバミン
 オロチン酸
 オキサゼバム
 オキシメタゾリン
 オキシフェンブタゾン
 ベモリン
 ベンタゾシン
 フェンシクリジン
 1-フェンシクロヘキシルアミン
 フェネルジン
 フェンホルミン
 フェンメトラジン
 フェンテルミン
 フェニルプロパノールアミン
 フェニトイン
 ピペラセタジン
 ピロキシカム

マプロチリン
 メラニン
 メフェニトイン
 メプロバメート
 メタドン
 d-メタンフェタミン
 メタピリレン
 メトカルバモール
 メトキシフェナミン
 メトスクシミド
 3,4-メチレンジオキシアンフェタミ
 ン(MDA)
 3,4-メチレンジオキシ-メタンフェ
 タミン(MDMA)
 メチプリロン
 メトプロロール
 6-モノアセチルモルフィン
 モルフィン
 ナフシリン
 ナロルフィン
 ナルトレキソン
 ナプロキセン(*)
 ニコチン
 ニフェジピン
 ノミフェンシン
 N-ノルコデイン
 ノルエチンドロン
 N-ノロキシモルホン
 ノルトロボキシフェン
 シス-10-OH-ノルトリブチリン
 ニリドリン
 オビプラモール
 オルフェナドリン
 オキシコドン
 オキシモルホン
 バーネート
 ベニシリンG
 フェナセチン
 4-OHピップフェンシクリジン
 フェンジメトラジン
 フェネチルアミン
 フェニラミン
 フェノチアジン
 フェニルブタゾン
 フェニルトロキサミン
 ピセナドール
 1-ピペラジノシクロヘキシフェン
 塩化カリウム

プラゾシン
 プレドニゾン
 プリロカイン
 プロカインアミド
 プロクロルペラジン
 プロリント
 プロメタジン
 プロプラノール
 プロトリプチリン
 ピリラミン
 キニン
 サリチル酸
 セロトニン
 スドキシカム
 スルファメトキサゾール
 スルインドック
 テストステロン
 テトラシクリン

テトラヒドロコルチゾン
 テバイン
 テオフィリン
 チオリダジン
 トルブタミド
 トリアムテレン
 トリフルプロマジン
 トリメトプリム
 トリベレナミン
 トロバ酸
 トリブタミン
 尿酸
 ソメビラック

*) 500 μ g/mlで試験

**) 1000 μ g/mlで試験

***) 10 μ g/mlで試験

【0157】本発明方法の他の利点は、尿中に普通に検出される化合物による干渉が無いことである。本発明の検定法(トレーサーは前記式[5]の構造を有し、抗体は前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する)では、正常なヒトのバルビツレート含有尿へ薬物を添加したとき、該添加薬物(下記表7に記載の濃度の化合物で、尿に普通に検出され、かつ本発明の検定法の如き全ての免疫学的検定法を干渉する能力を有し、このため、

プレドニゾン
 プレグネノロン
 プロベネシド
 プロカイン
 プロゲステロン
 プロマジン
 プロボキシフェン
 プロピルヘキセドリン
 プロイドエフェドリン
 キニジン
 ラニチジン
 スコボラミン
 ストリキニン
 スルファメタジン
 スルファチアゾール
 ターブタリン
 テトラカイン
 11-ノルデルタ-9-テトラヒドロ
 カンナビノールカルボン酸-9(***)
 テトラヒドロソリン
 テニルジアミン
 チオプロバゼート
 チオチキセン
 トラゾドン
 トリフルオベラジン
 トリヘキスフェニジル
 トリミブタミン
 トリプロリジン
 トロビン
 チラミン
 ワルファリン

潜在的に検定法の結果を不正確にする化合物)の検出誤差が10%以下である。本発明の検定法の最も好ましい具体例(トレーサーは前記式[30]の構造を有し、抗体は前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する)は、尿に普通に検出される化合物による干渉が同様に無くなることを明らかにした。

【0158】

表7

化合物	試験濃度
アセトン	1.0 g/dL
アスコルビン酸	1.5 g/dL
ビリルビン	0.250 mg/dL
クリアチニン	500.0 mg/dL
エタノール	1.0 g/dL

65	66
グルコース	2.0 g/dL
NaCl	6.0 g/dL
シュウ酸	100.0 mg/dL
プロテイン	0.05 g/dL
リポフラビン	7.5 mg/dL
溶解赤血球 (Hgb 濃度)	115.0 mg/dL
尿素	6.0 g/dL

【0159】本発明方法の他の利点は、各試料間(1つの試料から他の試料へ)の薬物から生じるキャリオーバーが少ないことである。前記式[5]の構造を有するトレーサーおよび前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する抗体を用い、アボット・ラボラトリーズのA * Di ドラッグス・オブ・アブユース・システムで119 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の正常なヒトの尿中のセコバルピタール溶液を検定し、次いでクリニカル・アナライザーの同じキャロウセル(carousel)で正常なヒトの無薬物尿の試料を検定した後、下記表からキャリオーバーを算出した。

無薬物尿中に検出されるセコバルピタールの測定濃度

$$\text{キャリオーバー率}(\%) = \frac{\text{セコバルピタール溶液の濃度}}{\text{セコバルピタール溶液の濃度}} \times 100$$

【0160】キャリオーバーを測定したところ、0.02%以下であった。前記式[30]の構造を有するトレーサーおよび前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する抗体を用い、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の正常なヒトの尿中のセコバルピタール溶液を検定した後、同様にキャリオーバーを測定したところ、0.03%以下であった。

【0161】さらに、本発明方法の他の利点は、薬物測定の正確さである。本発明の、前記式[5]の構造を有するトレーサーおよび前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する抗体を用いる検定法の正確さも、極めて

よく好都合のものであった。検定法の再現性は、2週間に及ぶ13回の検定操作において、4つの複製をそれぞれ正常なヒトの尿中の0.4、0.6および1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のセコバルピタールで検定することにより判断した。各複製の濃度は、実験の1日目のシングルでの標準曲線操作から判定した。これらの実験の結果として、たとえば変動率は6%以下であった。代表的データを下記表8(a)に示す。

【0162】

表8(a)

	濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
標的値(n=52)	0.4	0.6	1.00
平均	0.41	0.60	1.00
操作内の標準偏差	0.02	0.02	0.03
操作内の変動率(%)	5.10	2.95	3.05
操作間の標準偏差	0.02	0.02	0.04
操作間の変動率(%)	5.28	3.48	3.83

【0163】前記式[30]の構造を有するトレーサーおよび前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する抗体を用いる検定法の再現性は、2週間に及ぶ10回の検定操作において、5つの複製をそれぞれ正常なヒトの尿中300、800および1500 ng/ml のセコバル★40

★ピタールで検定することにより判断した。これらの実験結果として、たとえば変動率は7%以下であった。代表的データを下記表8(b)に示す。

【0164】

表8(b)

	濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
標的値(n=50)	300	800	1500
平均	286.31	804.77	1448.04
操作内の標準偏差	8.41	37.88	37.99
操作内の変動率(%)	2.94	4.71	2.62
操作間の標準偏差	17.73	40.83	45.12
操作間の変動率(%)	6.19	5.07	3.12

【0165】加えて、両組合せおよびパネルモードの3つの複製において、乱用薬物検定用のアボット・ラボラ

67

トリーズのADxシステムズ・マルチコンスチチューエント・ロウ・コントロールを操作することにより、正確さを測定した。代表的データを下記表9(a)(トレーサーは前記式[5]の構造を有し、抗体は前記式[28]の構造*

表9(a)

	濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)
標的値(n=54)	0.8
平均	0.59
操作内の標準偏差	0.03
操作内の変動率(%)	4.51
操作間の標準偏差	0.03
操作間の変動率(%)	4.73

[0167]

表9(b)

	濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)
標的値(n=54)	300
平均	273
操作内の標準偏差	16.88
操作内の変動率(%)	6.18
操作間の標準偏差	16.90
操作間の変動率(%)	6.19

【0168】さらに、本発明方法の利点は検定法の正確さである。本発明の検定法の回復の正確さは、正常なヒトの尿および希釈緩衝剤に、既知量のセコバルビタールを表10(a)では0.2、0.4、0.7、1.2および2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のレベルまで、また表10(b)では200、400、700、1200および2000 ng/mL のレベルまで加えて、2組のキャリブレーションを行うことによって判定した。尿キャリブレーションを用いてキャリブレーションを行い、このキャリブレーションに対し、アボット・ラボラトリーズのTDxクリニカル・アナライザーで2組のキャリブレーションを検定した。回復率は、

*を持つ免疫抗原に対して産生する)および表9(b)(トレーサーは前記式[30]の構造を有し、抗体は前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する)に示す。
【0166】

下記数式に従って算出した。

$$\text{回復率} = \frac{\text{尿中の測定濃度}}{\text{緩衝剤中の測定濃度}} \times 100$$

代表的データを下記表10(a)(トレーサーは前記式[5]の構造を有し、抗体は前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する)および表10(b)(トレーサーは前記式[30]の構造を有し、抗体は前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する)に示す。

【0169】

表10(a)

標的濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	緩衝剤中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	尿中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回復率
0.2	0.18	0.20	111.1
0.4	0.38	0.41	107.9
0.7	0.69	0.72	104.4
1.2	1.16	1.22	105.2
2.0	1.96	2.02	103.1

平均回復率=106.3 \pm 3.2%

[0170]

表10(b)

標的濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	緩衝剤中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	尿中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回復率
200	185	200	92.5
400	398	412	96.6
700	699	692	101.0
1200	1231	1256	98.0
2000	2047	2068	99.0

平均回収率=97.1±2.5%

【0171】また本発明の検定法を以下の方法により、他のバルビツレート類の検出法、たとえばガスクロマトグラフィー(GC)/マススペクトロ(MS)、同位元素標識免疫定量法(RIA)およびEMIT(登録商標)と比較した。すなわち、この比較で無薬物尿検体とバルビツレート含有尿検体とバルビツール代謝産物を検定した。代表的データを下記表11(a)(トレーサーは前記式[5]の構造を有し、抗体は前記式[28]の構造を持つ免疫抗原に*

*対して産生する)、表11(b)(トレーサーは前記式[30]の構造を有し、抗体は前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する。EMITと比較)、および表11(c)(トレーサーは前記式[30]の構造を有し、抗体を前記式[29]の構造を持つ免疫抗原に対して産生する。RIAと比較)に示す。

【0172】

表11(a)

試料タイプ	試料の数	本発明	試験法 (GC/MS)	EMIT/
d.a.u.		(Pos/Neg)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)
≥0.50 μg/mL	149	149/0	149/0	149/0

【0173】

表11(b)

試料タイプ	試料の数	TDx	ADx	EMIT	GC/MS
	(N)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)
<200ng/mL	128	0/128	0/128	0/128	2 ¹ , 3 ¹ /0
≥200ng/mL	101	101/0	101/0	100/1	99/2 ¹ , 1 ¹
試料No.	TDx	ADx	EMIT	GC/MS	同定化合物
	ng/mL	ng/mL	Pos/Neg	ng/mL	
1	110.62	73	POS	228	フェノバルビタール
2	156.69	150	NEG	230	フェノバルビタール
3	1911.93	高	POS	0	グルテチミド
4	246.13	283	NEG	193	フェノバルビタール

【0174】

30

表11(c)

試料タイプ	試料の数	TDx	ADx	RIA	GC/MS
	(N)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)	(Pos/Neg)
<200ng/mL	108	0/108	1 ¹ /107	0/108	2 ¹ , 3 ¹ /9
≥200ng/mL	91	91/0	91/0	78/13	97 NT, 91/0
試料No.	TDx	ADx	RIA	GC/MS	同定化合物
	ng/mL	ng/mL	Pos/Neg	ng/mL	
1	184.13	203	NEG	202	フェノバルビタール
2	125.00	127	NEG	207	フェノバルビタール

【0175】本発明について上述の如く個々の場合について説明したが、当業者であれば本発明の精神に即して多くの改変や変更を適宜に成しうるであろう。これらの改変や変更は、特許請求の範囲および発明の詳細な説明に基づく技術的範囲に属するものである。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 D 405/12

8829-4C

G 0 1 N 33/536

D 8310-2J

// A 6 1 K 39/395

D 8413-4C

(72)発明者 ロバート・エドワード・ダブラー
アメリカ合衆国60031イリノイ州ガーニー、
アデレ・ドライブ5041番

(72)発明者 ジョナサン・グロウト
アメリカ合衆国60030イリノイ州グレイス
レイク、ダーハム・レイン753番

(72)発明者 パトリック・エフ・ジョナス
アメリカ合衆国60085イリノイ州ワウクガ
ン、アレキサンダー・コート1608番

(72)発明者 ジェイン・アン・ネルソン
アメリカ合衆国60074イリノイ州バラティ
ン、コンステイテューション・ドライブ
3、623番